

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**TRANSPLANTE DE CÉLULAS MADRE
HEMATOPOYÉTICAS A EMBRIONES PREINMUNES VÍA
CELOCENTESIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Antonio León Luis

Bajo la dirección de los doctores

José Antonio Clavero Núñez
María Ángeles Muñoz Fernández
Joaquín Santolaya-Forgás

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA Y CIRUGÍA

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS A EMBRIONES
PREINMUNES VÍA CELOCENTESIS.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por

JUAN ANTONIO LEÓN LUIS

Madrid, 2004

Tesis Doctoral

**TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS A EMBRIONES
PREINMUNES VIA CELOCENTESIS**

Tesis presentada para optar al grado de

**DOCTOR EN MEDICINA
Y
CIRUGÍA**

*en la Facultad de Medicina de la
Universidad Complutense*

Por

Juan Antonio León Luis

Dirigida por los Dres. :

D. José Antonio Clavero Núñez.

Dña. María Angeles Muñoz Fernández.

D. Joaquín Santolaya-Fórgas.

Madrid, Abril de 2.004

EL DR. D. JOSE ANTONIO CLAVERO NUÑEZ, CATEDRATICO Y
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DE
LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID.



CERTIFICA: Que la memoria titulada “*TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYETICAS A EMBRIONES PREINMUNES VIA CELOCENTESIS*”, presentada por D. Juan Antonio León Luis, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a

VºBº El Director

LA DRA. DÑA. MARIA ANGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ, DOCTORA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. DOCTORA EN PEDIATRÍA. ADJUNTA
DEL LABORATORIO DE INMUNO-BIOLOGÍA MOLECULAR DEL
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO “GREGORIO MARAÑÓN” DE
MADRID.



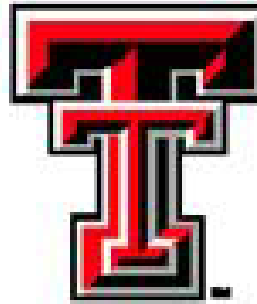
CERTIFICA: Que la memoria titulada “*TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYETICAS A EMBRIONES PREINMUNES VIA CELOCENTESIS*”, presentada por D. Juan Antonio León Luis, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a

VºBº El Director

EL DR. D. JOAQUIN SANTOLAYA FORGAS, DOCTOR EN
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA. PROFESOR DE OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA Y DIRECTOR DE LA UNIDAD DE MEDICINA
REPRODUCTIVA, ECOGRAFÍA Y MEDICINA FETAL DE LA
UNIVERSIDAD DE TEXAS TECH, AMARILLO, TEXAS, EE.UU.



CERTIFICA: Que la memoria titulada “*TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYETICAS A EMBRIONES PREINMUNES VIA CELOCENTESIS*”, presentada por D. Juan Antonio León Luis, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a

VºBº El Director

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Texas Tech y el Women's Health Research Institute. Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación concedida por el Women's Health Research Institute y el Fondo de Investigaciones Sanitarias.

*A mis padres, Juan Antonio y María Candelaria
y a mis hermanos, Marjorie y Marcos.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible la culminación de esta tesis.

Muchas Gracias !



ÍNDICE.

1. SUMMARY.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Terapia Génica.....	1
2.1.1. Terapia génica durante el período embrionario-fetal.....	3
2.2. Células madre.....	4
2.2.1. Obtención de células madre.....	5
2.3. Células madre hematopoyética.....	6
2.3.1. Secuencia génica del antígeno CD34.....	7
2.3.2. Estructura de la proteína CD34.....	8
2.3.3. Expresión del antígeno CD34.....	8
2.4. Desarrollo del sistema hematopoyético. Importancia en el trasplante de células madres hematopoyéticas.....	9
2.4.1. Compartimiento celular.....	11
2.4.2. Linfopoyésis: desarrollo del sistema linfóide T y las células NK.....	16
2.5. Células madre hematopoyéticas CD34+ presentes en la sangre del cordón umbilical.....	18
2.5.1. Técnica de recogida y composición de la sangre del cordón umbilical.....	18
2.5.2. Reconstitución de la hematopoyesis mediante la utilización de células CD34+.....	20
2.6. Tratamiento <i>in utero</i> con células madre hematopoyéticas.....	21
2.6.1. Tratamiento con células madre hematopoyéticas.....	22
2.6.2. Interés actual por desarrollar el tratamiento <i>in utero</i> con células madre hematopoyéticas.....	22
2.7. Desarrollo de las estructuras embrionarias y extraembrionarias: visualización y seguimiento ecográfico durante el periodo embrionario preimmune.....	24
2.8. Estadios de Carnegie del desarrollo embrionario.....	26
2.9. Ecografía a lo largo del primer trimestre de gestación.....	27
2.10. Breve descripción de los procedimientos utilizados actualmente para el diagnóstico y tratamiento prenatal en embriones preinmunes.....	30
2.10.1. Celocentesis.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
4. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS.....	39
4.1. Diseño del estudio. Sujetos y periodo del estudio.....	40
4.1.1. Estudios en humanos.....	40
4.1.2. Estudios en animales de experimentación.....	41
4.2. Protocolo clínico.....	43
4.2.1. Variables estudiadas en humanos.....	43
4.2.2. Variables estudiadas en los animales de experimentación.....	46
4.3. Técnicas de laboratorio.....	48
4.3.1. Extracción y procesamiento de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos. Obtención de las células mononucleares y plasma sanguíneo.....	48

4.3.2.	Extracción y procesamiento del suero sanguíneo	49
4.3.3.	Aislamiento y criopreservación de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos. Técnica de separación inmuno-magnética.....	49
4.3.4.	Cultivos celulares	50
4.3.5.	Cuantificación de las subpoblaciones celulares por citometría de flujo	53
4.3.6.	Determinación del <i>xenoquimerismo</i>	55
4.3.7.	Creación de un catálogo de moléculas medidas en el líquido extracelómico humano. Revisión bibliográfica.....	59
4.4.	Técnica de trabajo con los animales de experimentación	60
4.4.1.	Estudios en animales	60
4.4.2.	Celocentesis.....	64
4.4.3.	Estudios ecográficos durante el primer trimestre del desarrollo embrionario.	66
4.4.4.	Estudios ecográficos durante el primer, segundo y tercer trimestre del período gestacional.....	66
4.4.5.	Control de los valores hematológicos en babuinos durante la gestación	67
4.4.6.	Estudio de las variables perinatales en humanos y babuinos	67
4.4.7.	Evolución de la curva de crecimiento ponderal de los recién nacidos babuinos a término durante el primer semestre de vida postnatal.....	67
4.5.	Técnicas estadísticas	68
4.5.1.	Procesamiento de los datos	68
4.5.2.	Distribución de las variables	68
	Métodos paramétricos	68
5.	RESULTADOS	71
5.1.	Estudios en humanos	72
5.1.1.	Características clínicas materno-neonatales de las muestras recogidas de sangre de cordón umbilical	72
5.1.2.	Porcentaje de pureza de las células CD34+ aisladas por separación inmunomagnética	76
5.2.	Relación entre el número de células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos y las variables clínicas obstétrico-neonatales	77
5.2.1.	Expansión <i>ex vivo</i> de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical.....	80
5.2.2.	Depleción de la subpoblación de células CD3+ por MACS en las células CD34+, procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos, expandidas <i>ex vivo</i>	83
5.3.	Estudios de supervivencia de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos sanos, deplecionadas de la subpoblación CD3+, en líquido extracelómico del babuino	87
5.4.	Análisis de la composición bioquímica del líquido extracelómico	89
5.5.	Estudios en animales de experimentación	95
5.5.1.	Validación del modelo animal babuino gestante como sustituto de la gestación humana, para los estudios de diagnóstico prenatal y de trasplante <i>in utero</i> de células madres hematopoyéticas a embriones preinmunes	95

5.6.	Trasplante de células madre hematopoyéticas CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos a embriones preinmunes vía celocentesis ecoguiada	118
5.6.1.	Control de los parámetros ecográficos gestacionales antes y después de la celocentesis	118
5.6.2.	Inyección de las células madre hematopoyéticas CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos a embriones preinmunes vía celocentesis ecoguiada	120
5.6.3.	Inyección secuencial, durante primer y segundo trimestre, de hCD34+ para determinar tolerancia al <i>xenotrasplante</i>	124
5.6.4.	Sustitución del líquido extracelómico por medio de cultivo y factores de crecimiento hematopoyéticos para facilitar la expansión <i>in vivo</i> de las células madre hematopoyéticas	126
5.6.5.	Riesgo de Aborto tras <i>xenotrasplante in utero</i> : Importancia del grupo sanguíneo, del número de células hCD34+ trasfundidas y de la depleción de células CD3+	127
5.7.	Estudios neonatales y técnicas para la detección de quimerismo humano-babuino, en los animales sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas hCD34+	132
5.7.1.	Resumen de las características clínicas perinatales	132
5.7.2.	Determinación del grupo sanguíneo mediante el test de aglutinación.	132
6.	DISCUSIÓN	140
7.	CONCLUSIONES	159
8.	ANEXOS	162
9.	BIBLIOGRAFÍA	269

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFP	Alfafetoproteína
CA	Circunferencia abdominal
CC	Circunferencia cefálica
CFU	Unidad formadora de colonias
CPA	Célula presentadora de antígeno
Cy	Anticuerpo monoclonal intracitoplasmático
DBP	Diámetro biparietal
D.T.	Desviación típica
EEC	Espacio extracelómico
EG	Edad gestacional
EE.UU.	Estados Unidos de Norte America
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EPO	Eritropoyetina
FACS	Citometría de flujo
FCS	Suero fetal de ternera
FC	Frecuencia cardíaca
FCF	Frecuencia cardíaca fetal
FISH	Hibridación in-situ con fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3-L	Factor ligando de la proteína T3
G-CSF	Factor de crecimiento granulocítico
GM-CSF	Factor de crecimiento granulo-monocítico
hCD34+	Célula madre hematopoyética humana CD34+
hCD34+CD3-	Célula madre hematopoyética humana CD34+ deplecionada de la subpoblación de células CD3+
hCD34+CD3+	Célula madre hematopoyética humana CD34+ que no están deplecionada de la subpoblación de células CD3+
HLA	Antígeno mayor de histocompatibilidad
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
IEE	Interrupción electiva del embarazo
IL	Interleucina
IP	Inhibidor de proteasas
Kb	Kilobases
Kd	Kilodaltons
LCC	Longitud cráneo caudal del embrión
LC	Longitud femoral
LEC	Líquido extracelómico

lpm	Latidos por minuto
MACS	Técnica de separación inmunomagnética
Máx	Valor máximo
M-CSF	Factor de crecimiento monocítico
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Min	Valor mínimo
ND	No determinado
NK	Células "asesinas naturales"
<i>p</i>	Nivel de significación estadística
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino-fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína peridinin clorofila
PFE	Peso fetal estimado
PHA	Fitohemaglutinina
SA	Saco amniótico
SCF	Factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas
SG	Saco gestacional
SM	Sangre materna
STR	<i>Short tandem repeat</i>
SV	Saco vitelino
TCR	Receptor de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPO	Trombopoyetina

1. SUMMARY

Introduction of human hematopoietic CD34+ stem cells from umbilical cord blood very early in fetal life may correct some inherited hematological disorders including hemoglobinopathies and other congenital immunodeficiencies. Due to the development of molecular diagnosis, some of those diseases can be diagnosed prenatally and *in utero* hematopoietic stem cell transplantation may offer a cure for those disorders. Some authors have already attempted transfusing hematopoietic CD34+ stem cells into the fetal peritoneum to cure inherited blood disorders. Early transfusions of CD34+ hematopoietic precursors have been performed at 14-16 weeks in human gestations and the first successful *in utero* treatment of severe combined immunodeficiency was reported in 1996. Our hypothesis is that greater tolerances to *xeno*antigens present in human cells and increased stem cell *xeno*engraftment may be possible if these cells are given between 36 and 46 days gestation in the baboon models, when the fetus is not immunocompetent via ultrasonographic-guided celocentesis procedure. We isolate CD34+ stem cells from human umbilical cord blood using immunomagnetic isolation kits and the safety of the celocentesis procedure in this model has also been reported. Baboons have similar implantation, early embryologic development and placentation to humans. Baboons are also large enough to allow ultrasonographic examinations and therefore represent an optimal model for *in utero* embryonic stem cell transfusion. We will test for *xenochimerism* by different methods on the neonatal samples to determine peripheral blood response in each animal that received human CD34+ cells *in utero*.

2, INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los avances en las técnicas de imagen, marcadores biológicos y moleculares y la introducción de las técnicas invasivas guiadas por ecografía, han incrementado el número de entidades diagnosticables durante el período prenatal. Entre éstas, podemos encontrar más de 4.000 afecciones monogénicas, y una variedad de enfermedades multifactoriales susceptibles de terapia génica (1, 2).

La terapia celular mediante la introducción de células madre hematopoyéticas en un paciente afecto de una enfermedad susceptible de tratamiento, es una forma de terapia génica. El alo-trasplante de células madre hematopoyéticas se sabe que puede ocurrir de forma natural en embarazos gemelares dicigóticos, que establecen comunicaciones placentarias *in utero* (1, 3). Esto se debe a que diversas características del embrión en desarrollo, brindan la oportunidad de tolerar sangre de un donante durante este periodo.

Si se perfeccionan los métodos de introducción de las células madre en el embrión, este tipo de tratamiento genético *in utero*, podría convertirse en una alternativa viable, sobre todo para tratar enfermedades metabólicas, inmunológicas y hematopoyéticas, de origen hereditario, antes de que el déficit genético haya comprometido significativamente a distintos órganos fetales (1, 2, 4). Además, la existencia de una “ventana inmunológica” en el desarrollo embrionario, previa al inicio de los procesos de capacitación tímica, con presencia de células T maduras, permite la tolerancia a antígenos extraños. En condiciones ideales, la transferencia génica iniciada durante este periodo daría lugar a una tolerancia prolongada, quizás permanente, si estos antígenos se mantienen de forma persistente, lo que evitaría cualquier respuesta inmune celular del huésped contra las células donadas y facilitaría el trasplante de otros órganos en un período postnatal (5, 6).

2.1. Terapia Génica

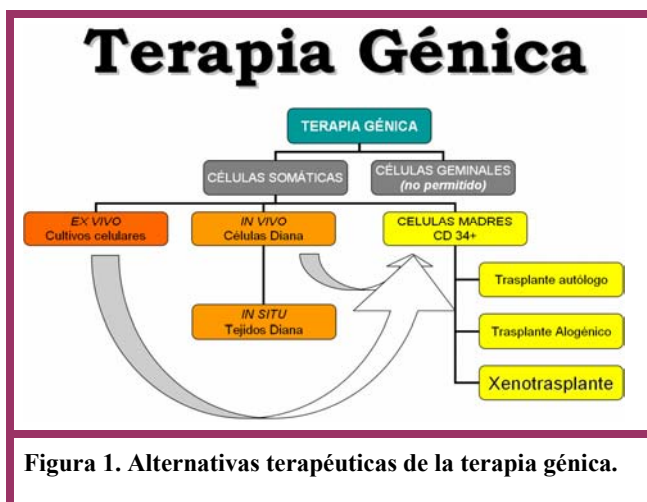
En la actualidad, ya se pueden vislumbrar los pasos que llevarán a la prevención y tratamiento de enfermedades genéticas mediante el uso de genes y células madre. La primera paciente sometida a un tratamiento génico, fue Ashanti Da Silva, una niña de 4 años, tratada por el equipo que dirige el Dr. Anderson, de los Laboratorios de Genética de la Universidad del Sur de California, en 1990, por presentar un defecto en el gen que codifica el enzima adenosín deaminasa. Inicialmente, se le extrajeron células madre de

su sangre y, en dichas células, se introdujo una copia normal del gen para, posteriormente, reinyectarlas al torrente sanguíneo de la niña. Tras 4 inyecciones, una mensual, la niña, que, por su inmunodeficiencia combinada grave, tenía que vivir en un ambiente estéril, comenzó a tener una vida normal hasta el día de hoy (2). Tres años más tarde, el equipo del Dr. Donal Kohn, en la misma Universidad, repitió la experiencia en tres recién nacidos afectados por la misma entidad, esta vez, introduciendo el gen sano en las células madre hematopoyéticas, procedentes del cordón umbilical, de dichos recién nacidos que, al igual que el caso de Ashinti, evolucionaron de forma favorable tras el tratamiento, convirtiendo dichas células en armas terapéuticas para las enfermedades hematopoyéticas (7).

En general, existen tres enfoques terapéuticos para las enfermedades hereditarias susceptibles de terapia génica (2):

1. *Introducción de genes sanos en las células somáticas responsables del fenotipo del paciente.*
2. *Trasplante de células madre sanas, autólogas o alogénicas, que permitan la creación de quimeras celulares estables en el paciente.*
3. *Fármaco genética: moléculas que corrijan la vía metabólica alterada en la célula, a través de la regulación de la expresión patológica del gen o de la acción u omisión patológica del producto del gen.*

A su vez, la terapia génica puede realizarse *ex vivo*, *in vivo* o, *in situ* (**Figura 1**).



La corrección genética *ex vivo* consiste en extraer células del enfermo, introducir en ellas copias normales del gen mutado, poder demostrar la integración del gen normal en el genoma celular, así como el funcionamiento de la maquinaria reguladora de la expresión del gen para que, finalmente, se reintroduzcan las células al paciente, como en el

caso de Ashanti Da Silva (2). La corrección *in vivo* (dentro del organismo), consiste en inyecciones sucesivas al paciente, de vectores portadores de los genes normales, que se incorporan de forma selectiva a las células diana. Por último, la corrección *in situ* (en el mismo lugar) implica el tratamiento de enfermedades localizadas en un órgano o tejido.

Son múltiples las alternativas para poder insertar un gen en una célula (2, 8, 9). Los genes pueden ser insertados directamente al núcleo de la célula mediante micropipetas hidráulicas bajo control microscópico o introducidos mediante un vector viral o no viral. Los virales incluyen retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes simple y lentivirus que, a pesar de ser vehículos muy eficientes en la transferencia génica, pueden provocar mutagénesis, silenciar la expresión de genes, o inducir una respuesta inmune *in vivo*. Los vectores no virales son menos eficaces, e incluyen los liposomas catiónicos, distintos polímeros, o DNA desnudo (10). Algunos vehículos requieren, además, el tratamiento de la membrana celular con corrientes eléctricas para abrir sus poros (electroporación) o tratamientos químicos que cumplan el mismo fin (1, 2, 11).

2.1.1. Terapia génica durante el período embrionario-fetal

La **tabla 1** describe algunas de las enfermedades que afectan a las células madre hematopoyéticas y que pueden ser diagnosticadas prenatalmente.

En la actualidad, no se contempla el tratamiento génico durante el periodo pre-implantacional ya que, en la mayoría de los casos, los embriones enfermos pueden ser seleccionados antes de la implantación. A partir de ciertos estadios del desarrollo embrionario puede contemplarse la posibilidad, en familias con riesgo elevado de presentar enfermedad hereditaria severa, y sin acceso a técnicas de fertilización *in-vitro* o diagnóstico pre-implantación, de realizar el diagnóstico prenatal y el tratamiento genético *in utero*, como alternativa al aborto terapéutico si el feto está afecto.

El objetivo del tratamiento *in utero* es reducir o evitar las secuelas de la enfermedad en cuestión que, en ocasiones, se manifiesta de forma prenatal (5, 12). Las distintas alternativas de terapia génica podrían aplicarse de forma prenatal. El tratamiento génico *ex vivo* sería posible, en periodos relativamente avanzados del desarrollo humano, utilizando células sanguíneas obtenidas del cordón umbilical fetal que, posteriormente, puedan reintroducirse en el feto. El tratamiento génico *in vivo*,

implicaría la inyección del vehículo directamente en el torrente circulatorio o en el peritoneo fetal, aunque no se podría controlar la incorporación generalizada del gen. Finalmente, el tratamiento génico *in situ*, introduciría el vehículo de forma directa en el tejido afecto. En éste último caso, dada la dificultad técnica, debe contemplarse en estadios avanzados del desarrollo utilizando la cirugía fetoscópica ecoguiada. Todo esto sin embargo, se encuentra actualmente en fase experimental (13-15).

2.2. Células madre

Toda célula madre se caracteriza por tener: 1) capacidad de *auto-renovación* (división celular sin diferenciación), 2) cierta capacidad de *reoblación celular a largo plazo* en el tejido donde se asientan, y 3) un elevado potencial *de diferenciación en múltiples líneas celulares* (división celular con diferenciación).

Las células madre se denominan *totipotenciales*, cuando pueden dar lugar a un organismo completo, o *pluripotenciales*, cuando pueden diferenciarse en células procedentes de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo o endodermo. Por último, se dice que las células madre son *multipotenciales*, cuando su capacidad de diferenciación se limita a los tipos celulares del órgano o tejido del cual proceden (1).

Conforme avanza el desarrollo embrionario, disminuye el potencial de

diferenciación celular, y así, tras la fecundación, y hasta el estadio de mórula (8-16 células), todas las células son *totipotenciales*. A partir de este momento, comienza un patrón de división diferencial, dependiente de la capacidad mitótica, que adquiere cada célula dentro de la mórula (polarización celular). Tras este periodo, se acumula líquido, pasando al estadio de blastocisto, donde se diferencian dos tipos de celulares: las células de la superficie del embrión (trofo-ectodermo), y las del interior del embrión (masa celular interna). De ésta última,

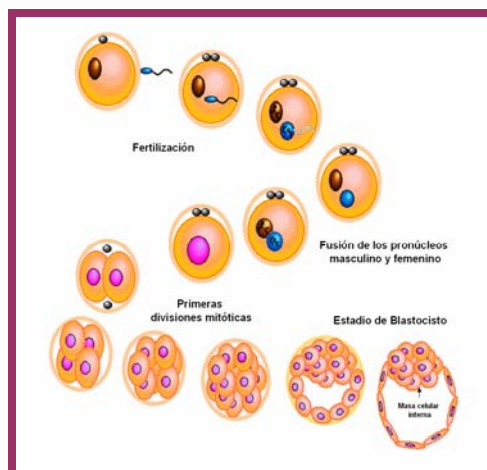


Figura 2. Desarrollo embrionario hasta la formación del blastocisto embrionario.

va a derivar el embrión propiamente dicho y por tanto, son células con carácter *pluripotencial* (14, 16). A continuación, y mediante el proceso de gastrulación, se

forman las estructuras embrionarias, adquiriendo, las células, un carácter *multipotencial* (Figura 2).

Tabla 1. Enfermedades susceptibles de terapia génica, clasificadas en función del tipo de célula afecta.

Entidad	Serie celular afectada	Herencia	Etiopatogénia	Localización de la alteración genética.
Anemia de Células Falciformes	Eritroide	HAR	Hemoglobinopatía	11 (11p15.5)
α Talasemia Major	Eritroide	HAR	Hemoglobinopatía	X (Xq13)
β Talasemia Major	Eritroide	HAD	Hemoglobinopatía	11 (11p15.5)
Enf. Granulomatosa Crónica	Leucocitaria	HAR lig-X o HAR	Déf. de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa	HAR lig a X (50-65%) y X (Xp21-1).
Agranulocitosis Infantil (Sd. De Kostmann)	Leucocitaria	HAR	Déf. de la elastasa neutrofila	19 (19p13.3)
Sd. Chediak Higashi	Leucocitaria	HAR	Déf. de la proteína LYST.	1 (1q42.1-q42.2)
Tromboastenia de Glanzmann	Plaquetaria	HAR	Déf. del receptor de fibrinógeno plaquetario	17 (17q21.32-17q21.32).
Mucopolipidosis Tipo I	EM	HAR	Déf. de neuraminidasa	6 (6p21.3)
Adrenoleucodistrofia	EM	HAR o HAR lig-X	Def. de lignoceroil-CoA ligasa	X (Xq-28).
Enf. de Hurler (MPS-1)	EM	HAR	Déf. de la enzima alfa-L-iduronidasa.	4 (4p16.3)
Enf. de Hunter (MPS-2)	EM	HAR lig-X	Déf. de sulfatasa del iduronato	28 (28 q)).
Sd de Sanfilippo (MPS-3)	EM	HAR	Déf. de la degradación del heparan sulfato.	17 (17q25.3)
Enf. de Morquio (MPS-4)	EM	HAR	Déf. de la enzima N-acetil galactosamina-6-sulfatasa (forma A) y beta-galactosidasa (forma B)	16 (16q24.3)
Síndrome de Sly (MPS-7)	EM	HAR	Déf. de β glucoronidasa	7 (7q21.11).
Mucopolipidosis Tipo IV	EM	HAR	Déf. de neuraminidasa	19 (19p13.3-p13.2)
Mucopolipidosis Tipo II	EM	HAR	Déf. de neuraminidasa	X (Xq28)
Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS-6)	EM	HAR	Déf. de arilsulfatasa B.	5 (5q11-q13)
Leucodistrofia Metacromática	EM	HAR	Déf. de Arilsulfatasa A	22 (22q13.31-qter)
Fucosidosis	EM	HAR	Def. de α -L-fucosidasa	1 (1p34)
Enf. de Fabry	EM	HAD lig-X	Déf. de α galactosidasa A	X (Xq22.1).
Enf. de Pompe	EM	HAR	Déf. de α glucosidasa ácida.	17 (17q25.2-q25.3).
Enf. de Niemann-Pick	EM	HAR	Déf. de esfingomielinasa	Tipos A y B: 11 (11p15)
Enf. de Gaucher	EM	HAR	Déf. de glucocerebrosidasa	1 (1q21).
Leucodistrofia de Células Globoides (Enf. de Krabbe)	EM	HAR	Deficit de galactosil ceramidasa	14 (14q31)
IMD de Wiskott Aldrich	IMD	HAR lig-X	Mutacion en el gen WAS	Xp11.23-p11.22

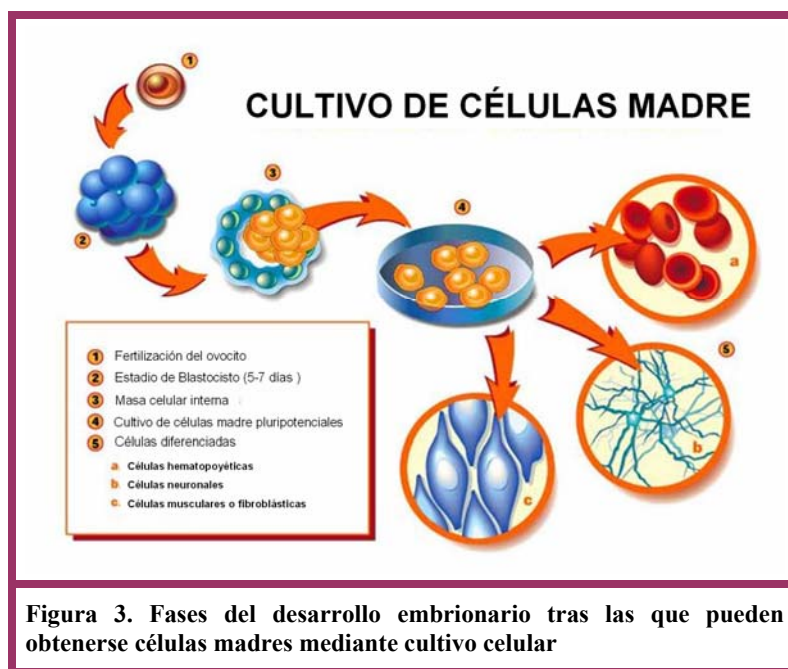
Enf: enfermedad; MSP: mucopolisacaridosis; EM: enfermedad metabólica; IMD: inmunodeficiencia; HAR: herencia autonómica recesiva; HAD: herencia autonómica dominante; lig-X: ligada al cromosoma X; Déf: déficit.

2.2.1. Obtención de células madre

La utilización de embriones como fuente de células madre es un tema de intenso

debate, así como, todos los aspectos relacionados con la clonación terapéutica. En la introducción de esta Memoria, se presentan las alternativas que existen como fuentes de células madre centrándose, principalmente, en la obtención de células madre hematopoyéticas a partir de la sangre del cordón umbilical tras el nacimiento.

Las células madre pueden extraerse de (**Figura 3**): 1) las células de la masa



celular interna del embrión, cuando está en fase de blastocisto, correspondiente al 5º día del desarrollo embrionario; 2) la clonación a partir de células somáticas del núcleo de las células adultas y 3) las células madre *multipotenciales* presentes en algunos tejidos. Por ejemplo, las células madre

hematopoyéticas localizadas en los sistemas hematopoyéticos primarios y secundarios, que incluyen el saco vitelino, el mesodermo para-aórtico, el hígado, la médula ósea y el torrente sanguíneo. De forma característica, la mayoría de estas células se encuentran en estado quiescente, excepto una subpoblación con capacidad formadora de colonias, que expresa el antígeno de superficie CD34 (17). Estas son las células madre hematopoyéticas que han sido aisladas y utilizadas clínicamente (18).

2.3. Células madre hematopoyéticas CD34+

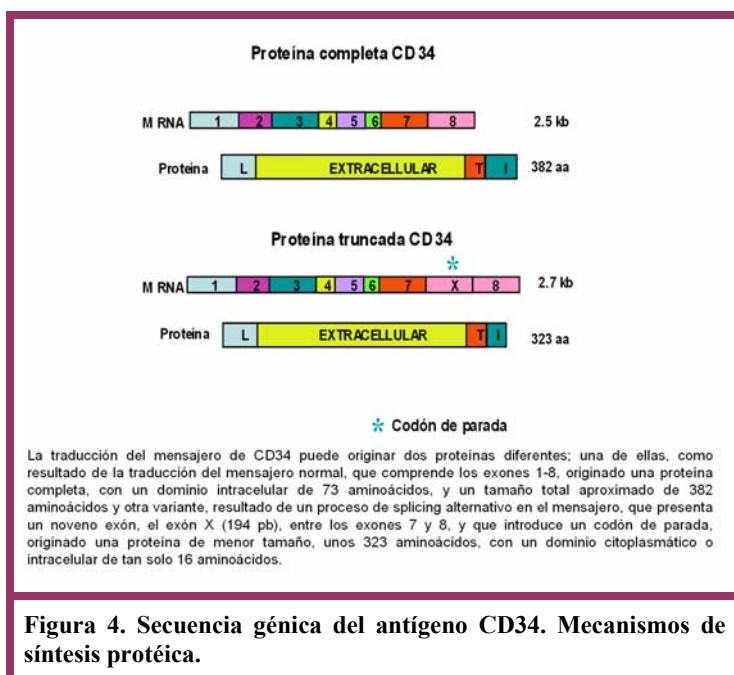
CD34 (CD o “*cluster of differentiation* número 34”) es una proteína de superficie de 382 aminoácidos, fuertemente glicosilada, que se expresa, preferentemente, en células madre de linaje linfo-hematopoyético, en células endoteliales, y en fibroblastos embrionarios (17). Aunque algunos autores han publicado la existencia de células con capacidad de repoblación hematopoyética que no expresan

CD34 (CD34 negativas) (19-21), esta población puede formar colonias *in vitro*, cuando se produce la expresión del antígeno CD34. Por ello, la expresión de CD34 es considerada como un indicador de célula hematopoyética primitiva (22).

2.3.1. Secuencia génica del antígeno CD34

El gen que codifica para el antígeno CD34 está localizado en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32) (23). El gen consta de 28 Kb, comprendidas en 9 exones y 8 intrones. Entre los exones 7 y 8, existe un exón, denominado X, que se expresa sólo tras

un proceso de *splicing* alternativo, y origina una proteína truncada de 323 aminoácidos (**Figura 4**) (24). La diferencia en longitud de la proteína resultante afecta a su dominio intracelular, y parece ser, que el *splicing* alternativo se relaciona con el grado de diferenciación de la célula progenitora (17). Desde el punto de vista evolutivo,



el gen que codifica para el antígeno CD34 está altamente conservado, de forma que la secuencia que codifica para el dominio intracelular de la proteína en humanos (exón 8), es homóloga en un 90% al de las proteínas CD34 presentes en especies inferiores; los dominios transmembrana y extracelular, en particular el extremo N-terminal de la proteína, presentan una homología de un 43% en las diferentes especies (25).

2.3.2. Estructura de la proteína CD34

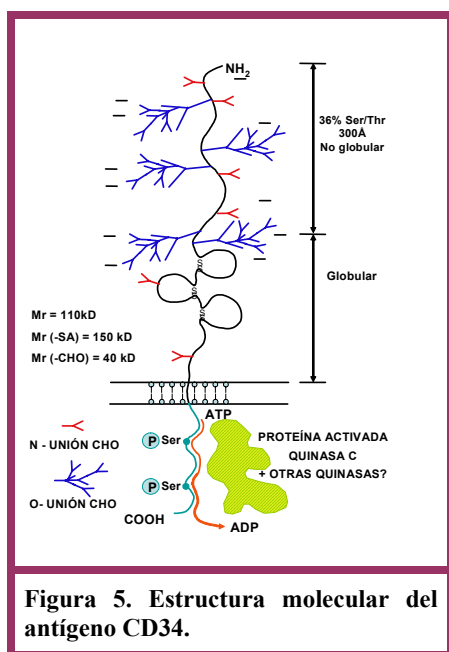


Figura 5. Estructura molecular del antígeno CD34.

El antígeno CD34 es una glico-fosfo-proteína monomérica de membrana tipo I, que contiene tres dominios estructurales: intracelular, transmembrana, y extracelular. Pertenece a la familia de las sialo-mucinas, y tiene un peso molecular de unos 40 Kd. La región extracelular está glicosilada y de ella parten residuos de N-glicanos y O-glicanos. Aunque no presenta ningún dominio enzimático, se sabe que en el dominio intracelular tiene residuos de serina, que participan en la activación de diferentes quinasas, implicadas a su vez, en la transmisión de señales intracitoplasmáticas (**Figura 5**) (23, 26).

2.3.3. Expresión del antígeno CD34

El antígeno CD34 se expresa en un 1-3% de las células de la médula ósea y de la sangre del cordón umbilical, y en un 0,1% de las células mononucleares de la sangre periférica del adulto (27). Aparece en las colonias formadoras de células hematopoyéticas, y en los precursores linfoides, tanto de línea de células T como B. Las células CD34+Lin- (Lin: sin linaje celular definido) representan la fracción celular CD34 más primitiva, ya que no co-expresan otros marcadores de superficie asociados a líneas celulares diferenciadas. Las células CD34+Lin- presentan mayor capacidad de repoblación hematopoyética en pacientes con mieloablación, y a mayor porcentaje de células CD34+Lin-, se relaciona con un mejor pronóstico tras el trasplante (17, 22). Además de las células madre hematopoyéticas, los osteoclastos, fibroblastos y células del endotelio vascular, expresan el antígeno CD34 (28).

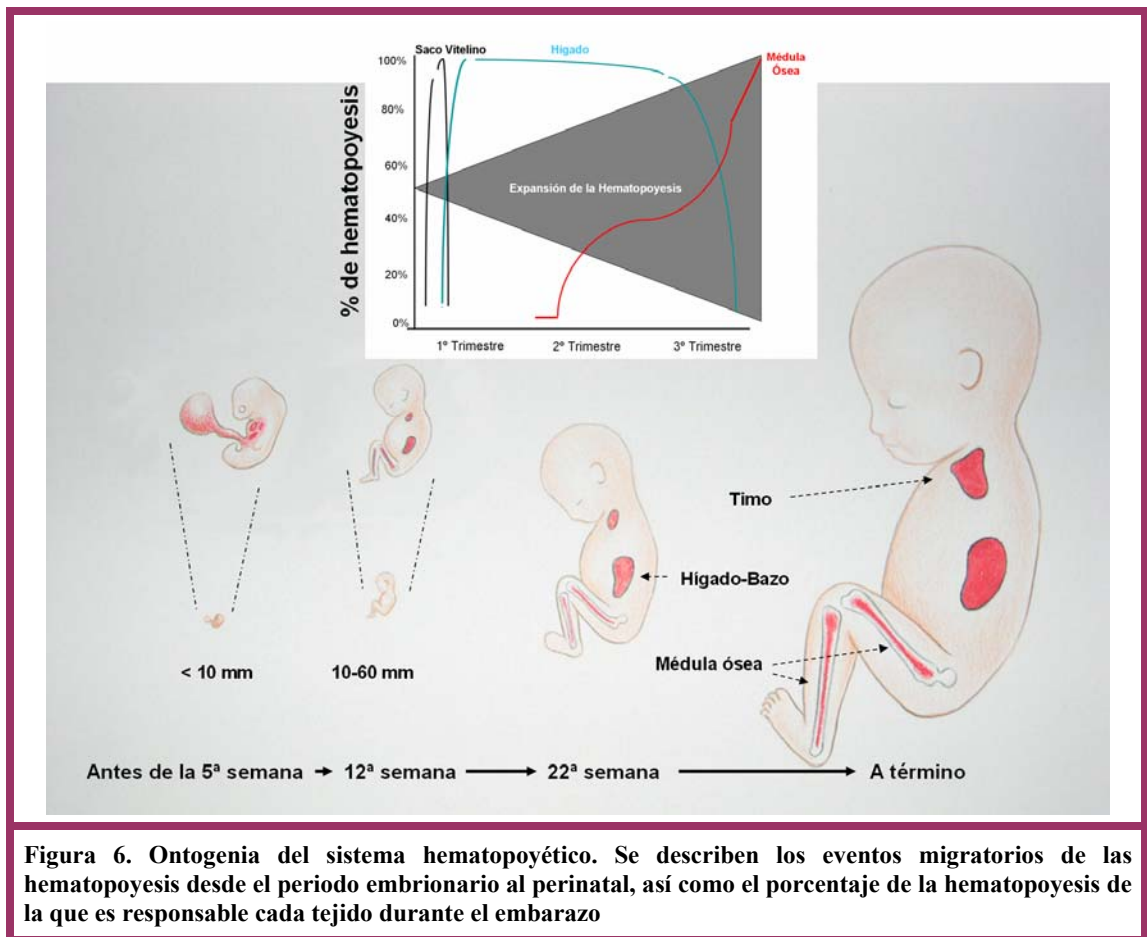
2.4. Desarrollo del sistema hematopoyético. Importancia en el trasplante de células madre hematopoyéticas

El éxito del trasplante de células madre hematopoyéticas, tanto prenatal como postnatal, depende de la creación de una quimera celular estable, y con capacidad de proliferación en el receptor. El término quimera, proviene de la mitología griega donde se empleaba para describir un animal compuesto por partes procedentes de distintos animales. Una quimera celular en un paciente, se logra tras la tolerancia inmunológica de células de un donante, por un individuo receptor (29, 30).

En los años 40, el Dr. Owen describió un caso de gemelos dicigóticos bovinos, con grupos sanguíneos distintos, que presentaban además una quimera estable de células con grupo sanguíneo del co-gemelo correspondiente. Este hecho representó la primera descripción de un quimerismo natural, y se cree que ocurre en el 8% de las gestaciones múltiples dizigóticas, que comparten circulación placentaria en humanos (31, 32). Basados en estos datos, Billingham, Brent y Medawar observaron que tras intercambiar injertos cutáneos y renales, en estos animales quiméricos adultos, existía una tolerancia permanente al injerto. El mismo Billingham, utilizando ratones, encontró que los inóculos provenientes de la médula ósea de neonatos, eran tolerados en otros animales y que dicha tolerancia no se alcanzaba utilizando inóculos provenientes de animales adultos(31). Además, demostró que dicha tolerancia era debida al déficit relativo de células T en el donante, responsables de la enfermedad de injerto contra huésped (31). En la actualidad, se acondiciona la médula ósea del receptor mediante un tratamiento mieloablativo, se trasplantan inóculos deplecionados de la fracción de células T y para alcanzar la tolerancia a largo plazo, se añade un tratamiento inmunosupresor (33). Sin embargo, estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia del desarrollo hematopoyético durante el periodo gestacional y la necesidad de abordar el periodo de ventana inmunológica *in utero* para alcanzar el injerto del inóculo y así, disminuir la morbilidad del paciente.

El sistema hematopoyético se desarrolla de forma multifocal (34). Conforme avanza la gestación, aparecen los órganos hematopoyéticos primarios: el saco vitelino y el mesodermo que rodea la aorta abdominal, el hígado, el bazo y la médula ósea (**Figura 6**). Esta última, representa el órgano hematopoyético por excelencia durante la vida postnatal y aquí, las células madre hematopoyéticas se diferencian hasta un estado

de célula precursora que, posteriormente, madura en el torrente sanguíneo.



2.4.1. Compartimiento celular

La producción diaria de células sanguíneas, en un adulto sano, es de alrededor de 10^{12} células/día, y está regulada por la interacción de factores solubles y ligados a

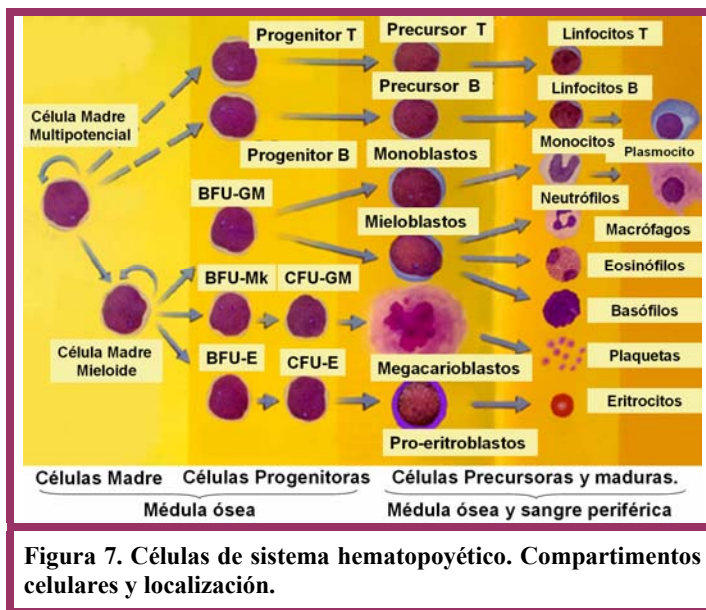


Figura 7. Células de sistema hematopoyético. Compartimientos celulares y localización.

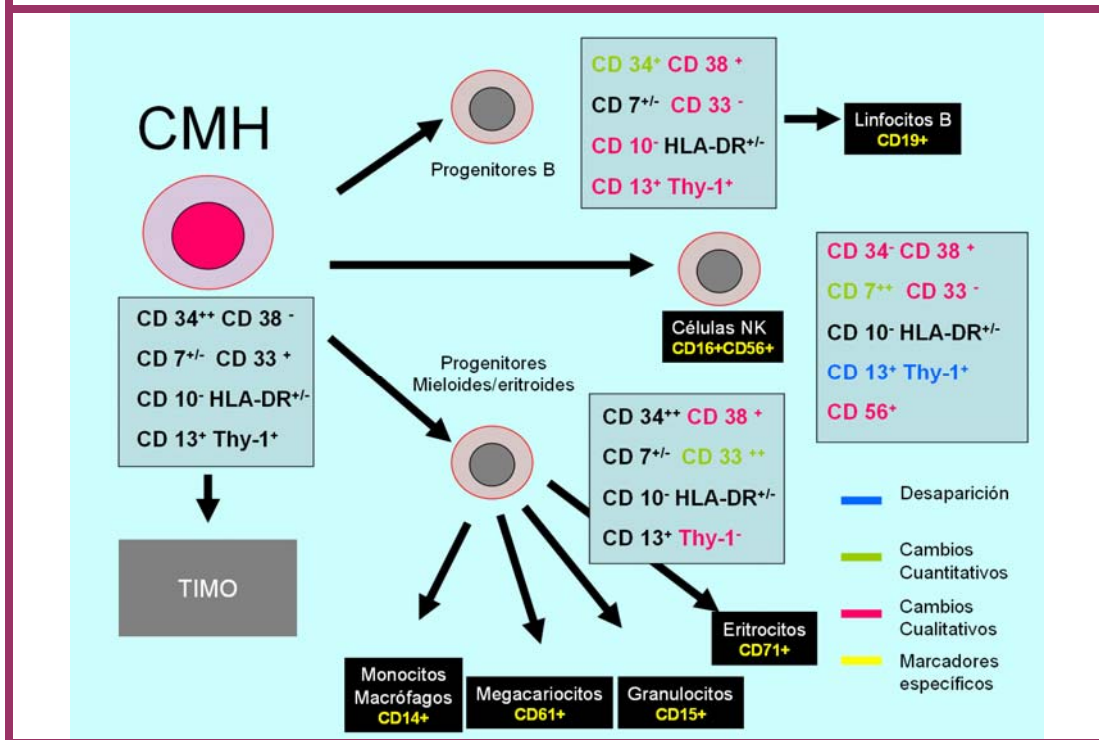
células progenitoras, y el compartimiento de células precursoras y maduras. Todas las células, a lo largo de su proceso de diferenciación, van progresando a través de estos compartimientos, perdiendo, paulatinamente, capacidad proliferativa y ganando aspectos morfológicos distintivos de las diferentes células maduras que originan y que son visualizables por microscopía óptica.

Las primeras evidencias de la existencia de células madre hematopoyéticas surgieron con los estudios de Jacobson y cols (36), que lograron recuperar la función medular de ratones irradiados, con extractos de bazo previamente extraídos del animal. Posteriormente, Till y McCulloch (37), acuñaron el concepto de unidad formadora de colonia esplénica (CFU-S) para definir las colonias que aparecen tras la infusión nodular en un trasplante murino. Las CFU-S a día 12 tras la infusión, contienen células que son capaces de repoblar a un receptor secundario (37). Las células del compartimiento madre son heterogéneas y comprenden células con capacidad variable de auto-renovación y diferenciación multilineal. Más adelante, la aparición de la citometría de flujo, que permite identificar las moléculas contenidas en el interior celular o en su membrana, define, el fenotipo de esta población celular, mediante la expresión del antígeno CD34, y dependiendo de la línea celular, expresarán marcadores

membrana, y factores estimuladores e inhibidores, y sus correspondientes receptores (35). Desde el punto de vista funcional, las células hematopoyéticas se pueden distribuir, fundamentalmente, en tres compartimientos diferentes (Figura 7): el compartimiento de células madre, el compartimiento de

específicos de una u otra línea celular: CD71 para la línea eritroide, CD13 para la línea gránulo-monocítica, CD14 para la línea monocítica, CD15 para la línea granulocítica, y CD61 para la línea megacariocítica (**Figura 8**) (38-40).

Figura 8. Proceso de maduración de la célula madre hematopoyética (CMH) con capacidad multilineal. El seguimiento en la expresión o no de los antígenos celulares a partir de la CMH mediante cambios cuantitativos (incremento y disminución) y cualitativos (pérdida o aparición en la expresión de nuevos marcadores) en la expresión de dichas moléculas, determina el subtipo celular en el que la CMH va a diferenciarse. En ocasiones, la CMH migra al timo, para dar lugar a la serie linfoide timo dependiente, entre los que figuran los linfocitos T.



A diferencia de las células de los compartimentos anteriores, las células del compartimento precursor/maduro pueden ser reconocidas por técnicas morfológicas. Dentro de cada línea celular se observan diferentes precursores: proeritroblastos, mieloblastos, monoblastos y megacarioblastos. Cada línea celular hematopoyética mieloide tiene un patrón de diferenciación propio y específico, con células reconocidas en los aspirados de médula ósea normales.

2.4.1.1. Citocinas y factores de crecimiento hematopoyéticos

Los factores de crecimiento hematopoyéticos fueron inicialmente descritos por

Bradley y Metcalf (41), y Pluznik y Sachs (42), como factores solubles que, en medios clonogénicos, inducían la producción de colonias. Durante la década de los 70 y 80, fueron descritas las características moleculares, así como la función de muchos de estos factores solubles, dada su capacidad para estimular diferentes tipos de colonias. Posteriormente, con la clonación de dichos factores, y la identificación de sus receptores, se han podido estudiar los mecanismos de acción diferencial sobre cada una de las células hematopoyéticas. Funcionalmente, las citocinas más ampliamente utilizadas en los cultivos de expansión han sido clasificadas por grupos, dependiendo de su espectro celular y de su capacidad de inducir proliferación y diferenciación celular (**Tabla 2**).

La terapia celular pretende ofrecer un tratamiento utilizando a las células y sus interacciones. La discriminación de las diferentes sub-poblaciones celulares ha llevado al diseño de modelos terapéuticos basados en sus funciones específicas (43, 44). La expansión celular *ex vivo* pretende aumentar ó generar un subtipo celular con propósito terapéutico mediante la utilización de técnicas de cultivo celular. Dichas técnicas se dividen clásicamente en los cultivos tipo Dexter o dependientes de estroma, y los cultivos dependientes de suero y citocinas. Los cultivos tipo Dexter suponen una forma *quasi* fisiológica de cultivo, donde las células estromales configuran un medio biofísico y bioquímico que simula al microambiente de la médula ósea. Una de las mayores limitaciones de este tipo de cultivo es conseguir estrómas alogénicos o estromas inmunológicamente inertes (14, 45). Los cultivos dependientes de suero y citocinas, se basan en proporcionar el sustrato bioquímico para la proliferación y la diferenciación celular. Su ventaja reside en la capacidad de dirigir, de forma unilineal o multilineal, la capacidad proliferativa de las células madre hematopoyéticas. Se ha demostrado que la utilización de SCF, FLT-3L, TPO, IL-3 e IL-6 promueve la proliferación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas (46-49). Particularmente, SCF incrementa la supervivencia de las células madre y las induce a dividirse de forma autoconservativa; FLT-3L, favorece el mantenimiento de las células madre en cultivo por su efecto antiapoptótico y TPO, IL-3 y/o IL-6 son citocinas que facilitan la acción de SCF y FLT-3 a la vez que estimulan la proliferación y diferenciación hematopoyética (50, 51).

Recientemente ha aparecido una estructura bio-inerte que proporciona a las células un soporte tridimensional poroso similar al microambiente medular, conocida

comercialmente como Cytomatrix. Algunos autores han encontrado que agregada a los cultivos con suero y citocinas, incrementa la capacidad de expansión *ex vivo* de las células madre hematopoyéticas (**Figura 9**).

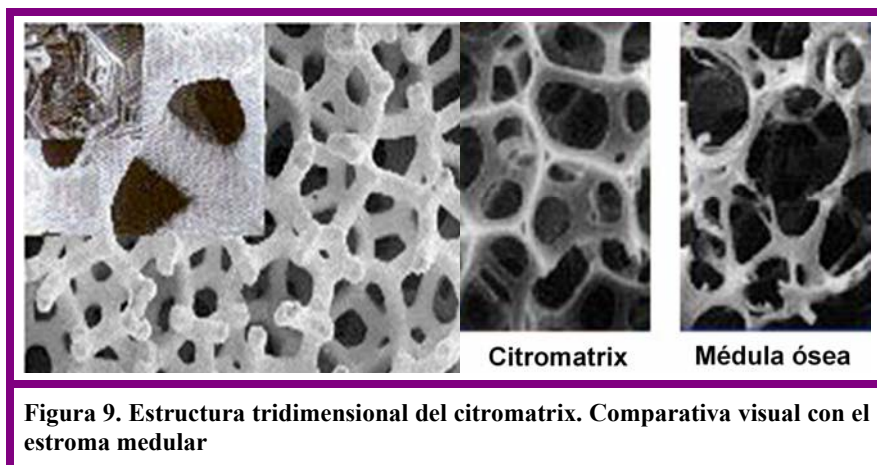


Tabla 2. Factores de crecimiento hematopoyéticos clasificados dependiendo de su función.

Factores específicos de una línea celular	Factores multilineales:	Factores específicos para células madre hematopoyéticas.	Factores sinérgicos o facilitadores
G-CSF (granulocítica), M-CSF (monocítica), EPO (eritrocitaria), TPO (plaquetas) e IL-5 (eosinofílica)	GM-CSF (granulo-monocítico, eosinófila y eritroide) e IL-3.	SCF (Factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas). FLT3-L (Factor ligando de la proteína T3).	IL-1, IL-6 e IL-11
Promueven la generación de CFU según el linaje celular y, finalmente, una maduración terminal linaje específica. Estas moléculas, además, actúan sobre otros modelos de regulación como la maduración endotelial (G-CSF), la activación de células B (IL-5), la activación recíproca de la serie roja y plaquetaria (EPO y TPO) ó el desarrollo del trofoblasto (M-CSF) (46-49)	En colaboración con EPO la GM-CSF facilita la expansión del linaje monogranulocítico, IL-3 supone una de las citocinas con mayor espectro celular de estimulación, aunque presenta menor capacidad de maduración terminal	Ambas moléculas promueven la supervivencia de las células madre y las inducen a entrar en el ciclo celular (52). En el caso de FLT3-L su receptor se ha localizado de forma característica en las células CD34+ (50, 51).	Amplifican la respuesta proliferativa celular, secundaria a otros factores. Su acción sinérgica es necesaria para optimizar cultivos de expansión de las células progenitoras (53).

2.4.2. Linfopoyésis: desarrollo del sistema linfoide T y las células NK

Hasta el momento en que el embrión o feto no desarrolle el sistema inmune, no podrá distinguir por completo lo propio de lo ajeno. Este es un periodo natural conocido como *periodo de tolerancia inmunológica*. Este periodo termina con el desarrollo y activación funcional del timo fetal (**Figura 9**) (54, 55). Nuevamente, ha podido realizarse el seguimiento de cada una de las subpoblaciones celulares, identificables mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula expresada en las células, por lo que antes de la semana 16 de gestación no se encuentran linfocitos T maduros en el torrente sanguíneo. Estas células hacen inmunocompetente al feto y se componen de dos tipos celulares distintos: células “T cooperadoras”: CD3+ CD4+ y células “T citotóxicas”: CD3+ CD8+.

En periodos anteriores se han intentado identificar progenitores linfoides, entre los que se han encontrado células que expresan CD45+CD7+CD3+ intracitoplasmático (cy), aunque sin marcadores propios de los linfocitos T (TCR, CD4+, CD8+) a partir de la 7ª semana de gestación en el saco vitelino e hígado fetal (**Figura 10**). A nivel hepático, y entre las 6ª y 24ª semana, algunas células CD45+CD7+ cyCD3+ también coexpresan CD56+, característico de las células NK (56). Estas observaciones han permitido la descripción de precursores tímicos, entre los que figuran las células progenitoras que expresan CD34+CD38- y CD33+. Además, células progenitoras que

coexpresan CD3+ en modelos animales, son de igual forma células primitivas que migran desde el hígado al timo fetal (57), Lobach y Haynes (55) opinan que el verdadero compromiso tímico solo se fundamenta cuando se expresa el antígeno CD7, y, probablemente, también CD2, CD5 y CD28. La adquisición de estos últimos marcadores se correlaciona con la pérdida de expresión de CD33 y CD34, y la adquisición de

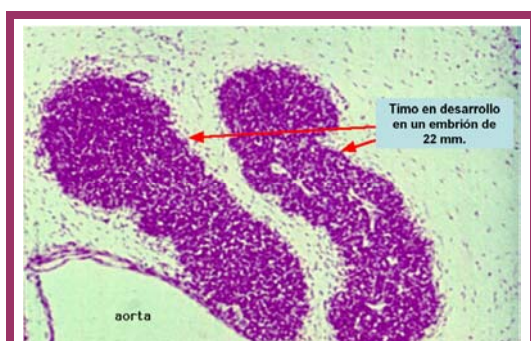


Figura 9. Histología del timo humano en un embrión de 22mm. Fuente
<http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/embryo/Series.html>.

expresión de CD38.

El proceso de maduración tímica de las células linfoides implica dos procesos fundamentales. En primer lugar, la “selección positiva” en el que las células epiteliales

del timo, destruyen las linfoides incapaces de reconocer el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del individuo, y por último, la “selección negativa”, en el que se destruyen las células capaces de reconocer los antígenos propios del individuo. Estos procesos se acompañan de una serie de cambios moleculares, distinguibles por citometría de flujo. Además, dentro del timo, las células linfoides reestructuran los genes de la molécula del TCR, receptor de los linfocitos T, unido a CD3, y característicamente adquieren la expresión de dobles positivos para CD4 (linfocito T cooperador) y CD8 (linfocito T citotóxico) que son sometidos, a una selección positiva y luego negativa, para dar lugar a un repertorio de linfocitos T maduros cooperadores o citotóxicos, que se multiplican a partir de las 14-16 semanas de gestación (**Figura 10**) (58).

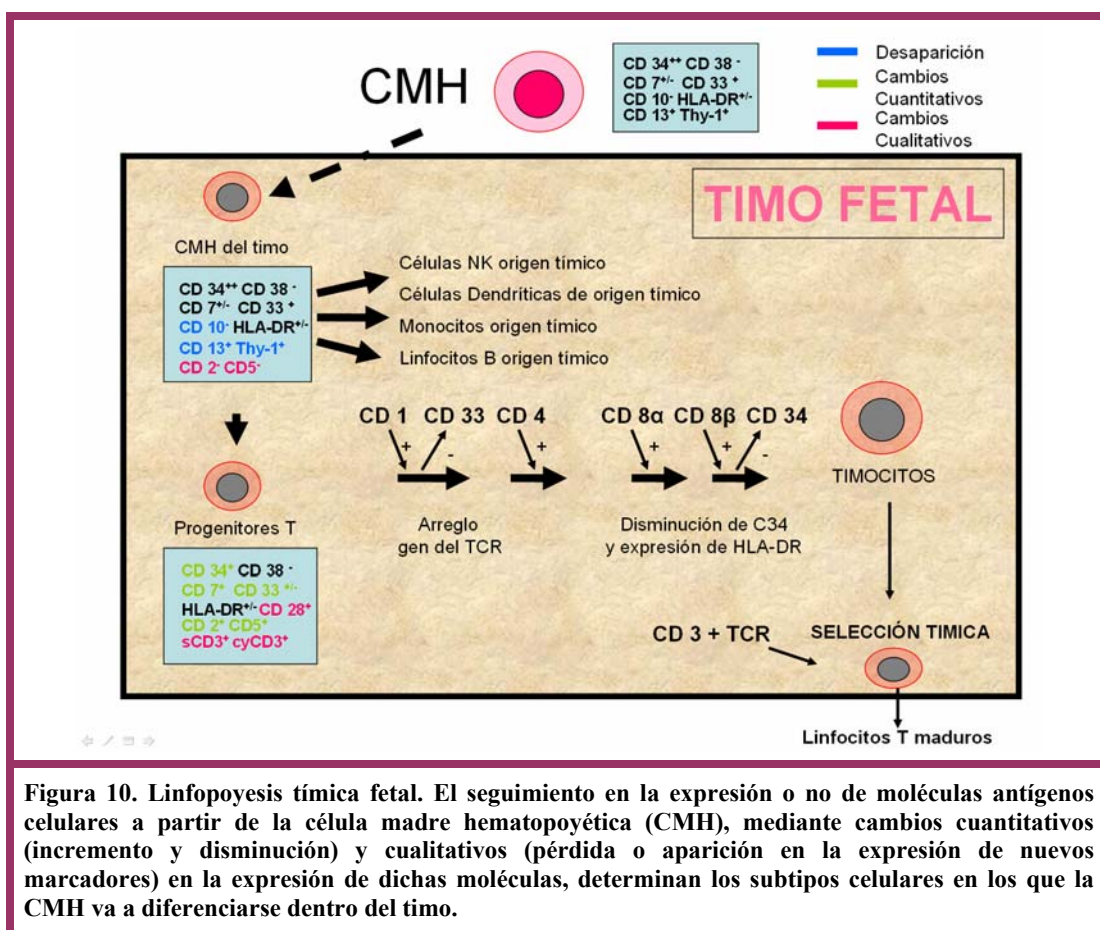


Figura 10. Linfopoyesis tímica fetal. El seguimiento en la expresión o no de moléculas antígenos celulares a partir de la célula madre hematopoyética (CMH), mediante cambios cuantitativos (incremento y disminución) y cualitativos (pérdida o aparición en la expresión de nuevos marcadores) en la expresión de dichas moléculas, determinan los subtipos celulares en los que la CMH va a diferenciarse dentro del timo.

2.5. Células madre hematopoyéticas CD34+ presentes en la sangre del cordón umbilical

Tras el nacimiento, la sangre que queda secuestrada en el cordón umbilical y la placenta es, habitualmente, desechada aunque contiene células madre y progenitoras del sistema hematopoyético con capacidad de regenerar la función de la médula ósea. Se ha estimado que en embarazos a término, los vasos placentarios tienen entre 75 y 125 ml de sangre (aproximadamente un 25 % del volumen sanguíneo del neonato) (59-61). Las arterias umbilicales se constriñen fisiológicamente tras el parto, evitando el flujo desde el feto hacia la placenta. Por el contrario, la vena umbilical permanece dilatada, permitiendo que la sangre placentaria circule en la dirección marcada por la gravedad. Es por eso que, tras el parto, los neonatos situados por debajo del nivel de la placenta ganan sangre, mientras que los situados por encima de ese nivel, pueden perderla. En embarazos a término normales, una cuarta parte de la sangre placentaria puede obtenerse durante los primeros 15 segundos postparto (clampaje precoz), y la mitad tras 60 segundos (clampaje tardío) (59, 62).

Sin embargo, el volumen de sangre placentario que puede ser recogido tras el parto depende del protocolo utilizado, y los protocolos dependen, a su vez, de la percepción del efecto que la sangre placentaria pueda tener en la volemia neonatal (63, 64).

2.5.1. Técnica de recogida y composición de la sangre del cordón umbilical.

Broxmeyer et al describe por primera vez el método de recolección de la sangre de cordón umbilical con intención de obtener células madres hematopoyéticas, útiles para el trasplante postnatal (65). En 1988, en un niño afecta de anemia de Fanconi, dicho autor realiza el primer trasplante de células madre hematopoyéticas procedentes de sangre del cordón umbilical de su hermano. Según dicho autor, la recolección de sangre se puede hacer mediante la punción de la vena umbilical de forma estéril (método cerrado), inmediatamente tras el clampaje del cordón, dejándola caer por gravedad a una bolsa de plástico que contiene 21 ml de anticoagulante EDTA. El drenaje de la sangre placentaria tarda una media de 3 minutos (60). Tras ello, se incrementa el volumen recogido mediante presión en el cordón a la salida de la sangre residual, o se puede efectuar una segunda punción, cerca de la inserción del cordón en la

placenta, para recoger la sangre exprimida por las últimas contracciones uterinas. Es importante que la sangre en la bolsa sea agitada frecuentemente para evitar la formación de coágulos.

También puede obtenerse la sangre del cordón mediante el aspirado con jeringuillas de 20 ml (método abierto), e ir almacenando la sangre en tubos de 10 ml con EDTA (66). En un estudio australiano, se ha comprobado que el drenaje de la sangre retenida en la placenta no aumenta el riesgo de retención placentaria o hemorragias maternas puerperales, pero si parece producir un acortamiento del tiempo hasta el alumbramiento, lo que podría, incluso, resultar beneficioso (67). Los resultados obtenidos en por ambos métodos han sido comparados en diversos estudios (61, 68, 69) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resultados comparativos entre los métodos cerrado y abierto de la obtención de la sangre del cordón umbilical del recién nacido.

Método Cerrado	Método Abierto
20 – 25 % de fallo	< 10 % de fallo
2 – 5 % de contaminación*	1 – 5 % de contaminación
Caída libre de la sangre	Constante visualización de la recolección
Pinchazo único	Múltiples pinchazos

* tras cinco días de cultivo.

A pesar de que se observan diferencias a favor del método abierto, hoy en día, no se ha estandarizado el método de obtención, y se pueden encontrar múltiples cambios metodológicos, a éstos dos, así como estudios comparativos en condiciones diversas (66).

Una vez recogida la sangre puede ser mantenida a temperatura ambiente durante, aproximadamente, doce horas antes de ser enviada al laboratorio para el procesamiento y el aislamiento de células madre hematopoyéticas. La **tabla 4** refleja los resultados medios de los parámetros hematológicos de la sangre del cordón umbilical del recién nacido. Las células CD34+ representan entre el 1-3% de las células nucleadas, y en cantidades menores pueden encontrarse otros tipos celulares como células dendríticas, células madre mesenquimales, y células maternas. Estas últimas han podido demostrarse, por la presencia de DNA de origen materno en el 25-30% de las muestras

de sangre del cordón umbilical (70, 71).

Tabla 4. Características de las células encontradas en la sangre del cordón umbilical del recién nacido. Los resultados se muestran en valor de la medias \pm desviación típica.

Serie Eritroide	Hematocrito	49% \pm 5
	Hemoglobina	15,3 \pm 1,3 g/dL
	Hematíes	4,3x10 ⁶ \pm 0,4/ml
	Volumen corpuscular medio	112 \pm 6 fl
	Hemoglobina corpuscular media	36,2 \pm 2,2pg
	Hematíes nucleados	3,13% \pm 1,11 de las células nucleadas
Serie Leucocitaria	Leucocitos	16,2 \pm 4,7 x 10 ⁶ /ml
	Granulocitos	(51 \pm 8%)
	Linfocitos	(40 \pm 7%).
	Monocitos	(5 \pm 4%)
	Eosinófilos otras células inmaduras	(4%)

2.5.2. Reconstitución de la hematopoyesis mediante la utilización de células CD34+

A la par de la sangre del cordón umbilical, se pueden obtener células CD34+ de la médula ósea, de la sangre periférica, previa estimulación con factores de crecimiento, movilizandolas células madre hematopoyéticas y del tejido fetal. Debido a la controversia que acompaña a la utilización de tejidos fetales, se comparan los resultados obtenidos en las restantes fuentes de células CD34+.

Existe una relación directamente proporcional entre el número de células CD34+ trasplantadas, y la probabilidad de alcanzar el injerto (72-75). A su vez, la co-expresión de CD34+CD133+ determina una subpoblación celular altamente enriquecida de células madre hematopoyética, de tal forma, que CD34+CD133+ es un factor predictivo positivo, independiente de la recuperación de granulocitos y plaquetas (76).

También se sabe que la expresión de ciertas moléculas de adhesión se relaciona con el porcentaje de injerto. Por ejemplo, la expresión de L-selectina incrementa el nivel de injerto de células de linaje mieloide (77).

La sangre del cordón umbilical es semejante a la sangre periférica previamente movilizada, y como esta responde al factor de crecimiento granulocítico (G-CSF), tiene un volumen de unos 80 ml y, por tanto, un potencial limitado como fuente de células CD34+ (78). Por otra parte, las células CD34+ en sangre periférica pueden obtenerse tras el procesamiento de hasta 15 litros de sangre (recirculación continua de la volemia), y, dado que el rendimiento actual de las máquinas de aféresis es de un 50%, el potencial

como fuente de células CD34+ de la sangre periférica es casi 100 veces mayor que el de la sangre del cordón umbilical. Debido a esto, algunos autores han sugerido que, para que la sangre del cordón umbilical pueda ser una alternativa a la sangre periférica, debe suplir la carencia relativa de progenitores con propiedades biológicas que le confieran una mayor calidad hematopoyética (79, 80).

Evidencias de que las células CD34+ del cordón umbilical podían reconstituir la hematopoyesis proceden de los resultados obtenidos tras experimentos con diluciones límite de células CD34+, que pusieron de manifiesto que el porcentaje de células que proliferan depende de las fuentes de progenitores, y que la mayor proliferación y capacidad de integración a largo plazo, proviene de células CD34+ del cordón umbilical, cuando se compara con la médula ósea o sangre periférica (81, 82). El análisis de marcadores primitivos también ha destacado la mayor frecuencia de células CD34+CD133+ en sangre del cordón frente a la presente en médula ósea o sangre periférica, lo que podría explicar la mayor capacidad de injerto de progenitores de sangre de cordón umbilical (79).

2.6. Tratamiento *in utero* con células madre hematopoyéticas

El tratamiento postnatal de niños afectos con enfermedades debidas a errores metabólicos de origen genético, utilizando células madre hematopoyéticas, está limitado por el bajo número de donantes compatibles, la necesidad de una terapia mieloablativa o inmunosupresora, la posibilidad de desarrollo de enfermedad injerto contra huésped y otros factores relacionados con la elevada morbilidad ya presente en el momento del diagnóstico (83). Las últimas décadas del siglo XX, han permitido el desarrollo de dos nuevas especialidades médicas: genética clínica y medicina fetal. La integración de la genética clínica, medicina fetal, los avances en el entendimiento de la biología celular y las aplicaciones terapéuticas de distinto tipo de células madre están suscitando un interés creciente en ver al feto como el objetivo del tratamiento de las enfermedades genéticas. La intención es poder diagnosticar enfermedades genéticas con alta mortalidad y morbilidad en estadios embrionarios muy precoces y proporcionar alternativas terapéuticas distintas al aborto (84, 85).

El tratamiento *in utero* con células madres es semejante al que se ofrece postparto pero con las ventajas de que todavía no existen manifestaciones orgánicas o clínicas, no se requiere mieloablación ya que el embrión no es inmunocompetente hasta

las 12-14 semanas de gestación, los órganos hematopoyéticos embrionarios están relativamente “vacíos”, lo que permitiría su colonización y durante el periodo gestacional las células madre hematopoyéticas se someten a un proceso de proliferación multifocal y multilineal, debida a la expansión celular masiva que acontece en el embrión en desarrollo (1, 86, 87).

2.6.1. Tratamiento con células madre hematopoyéticas

Según el *International Bone Marrow Transplant Registry* actualmente se tratan de forma satisfactoria más de 50.000 pacientes nuevos cada año y esta cifra se ve incrementada anualmente en torno al 10-15 % (88). El trasplante de células madre hematopoyéticas postnatal es parte del tratamiento vigente en procesos patológicos debidos a la disfunción propia de las células madre hematopoyéticas o de su linaje. Por lo general, el protocolo de tratamiento incluye un proceso mieloablativo que, aunque conlleva una toxicidad aguda, también elimina la mayoría de las células patológicas e inmunocompetentes del paciente y el trasplante de células madre hematopoyéticas de un donante permite la proliferación y expansión de clones celulares hematopoyéticos nuevos y sanos a nivel medular (33).

2.6.2. Interés actual por desarrollar el tratamiento *in utero* con células madre hematopoyéticas

La **tabla 5** hace referencia a algunas de las ventajas y desventajas del tratamiento *in utero*. Las ventajas podrían resumirse en: 1) reducción de abortos terapéuticos, 2) inducción de una tolerancia inmunológica a los antígenos del donante que permita un grado aceptable de quimerismo o la posibilidad de tratamientos postnatales sin inmunosupresión ni mieloablación (1, 89). El trasplante de células hematopoyéticas *in utero* se encuentra en fase experimental y quedan por resolverse una serie de cuestiones muy importantes antes de su posible aplicación clínica (90).

Por consenso, entre especialistas en genética clínica y medicina fetal, el tratamiento *in utero* es ofrecido a la madre cuando la enfermedad fetal puede generar secuelas significativas durante la gestación o el tratamiento postparto es incierto. Por ejemplo, el conjunto de enfermedades metabólicas de origen genético presentan una elevada morbi-mortalidad intrauterina y en la infancia.

Los problemas éticos derivados de la práctica del trasplante *in utero* con células

madre hematopoyéticas no han sido completamente definidos, si bien se presupone para esta práctica la utilización de principios éticos que incluyen el derecho a una información correcta y objetiva encaminada a permitir una decisión autónoma por parte del paciente (91). Cuando se trata de enfermedades genéticas o prenatales la información debe ser facilitada por genetistas clínicos entrenados en comunicar riesgos y opciones. La información debe ser clara, completa, comprensible y adaptada a las características personales de la paciente (idiosincrasia, cultura, religión, entre otras). Cualquier tratamiento de una enfermedad genética debe tener en cuenta los riesgos propios del procedimiento, así como las posibles consecuencias biológicas y psicológicas para el paciente y su familia (92, 93).

Tabla 5. Ventajas y desventajas del trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de corregir el defecto genético antes de que la enfermedad se manifieste de forma irreversible. • Riesgo reducido de rechazo debido a la inmadurez inmunológica del feto. • Posibilidad de inducir una inmunotolerancia específica a los antígenos del donante sin necesidad de acondicionamiento mieloablativo. • Posibilidad de realizar trasplantes sucesivos, tanto de células madre hematopoyéticas, como de otros órganos, procedentes del mismo donante tras alcanzar la tolerancia inmunológica frente a sus antígenos. • Disponibilidad de “espacio” en el estroma medular en desarrollo, que pueda permitir el injerto en dosis sucesivas. • El ambiente estéril del útero y el aislamiento del feto intraútero, permiten la posibilidad de una reconstitución inmunológica previa al nacimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se restringe a aquellas entidades congénitas que pueden diagnosticarse de forma prenatal. • Riesgo de abortos iatrogénicos. • Se desconoce el número de células madre hematopoyéticas inyectadas por kg de peso del paciente, a pesar de que las células transplantadas presentarían ventajas proliferativas frente a las del huésped. • Elevado porcentaje de fracasos a la hora de obtener el injerto o la tolerancia inmunológica. • Únicamente ha demostrado un porcentaje de éxito en inmunodeficiencias combinadas severas. • Consideraciones éticas del tratamiento <i>in utero</i> • Al igual que los tratamientos quirúrgicos <i>in utero</i> supone un procedimiento en fase experimental que debe demostrar su validez clínica y terapéutica.

2.7. Desarrollo de las estructuras embrionarias y extraembrionarias: visualización y seguimiento ecográfico durante el periodo embrionario preimmune

La introducción de células en los estadios iniciales del desarrollo embrionario, queda justificada por la tolerancia inmunológica presente en trasplantes en animales de experimentación y en la observación del quimerismo natural en gestaciones gemelares, tanto animales como en humanas (94, 95).

El desarrollo embrionario y extraembrionario se inicia tras la fecundación del óvulo por el espermatozoide, para formar el cigoto. Tras una serie de divisiones producidas en el cigoto, se forma el blastocisto que invade la decidua uterina y forma el saco gestacional (**Figura 2**). En el blastocisto se diferencian dos tipos celulares que formarán el embrioblasto y las células citotrofoblásticas que rodean la cavidad blastocelómica. Tras implantarse en la decidua materna, el saco gestacional queda totalmente rodeado por tejido citotrofoblástico durante el primer trimestre (96, 97). Aunque se desconoce como se diferencia el embrioblasto en los embriones humanos, la biología comparada ha demostrado que éste se separa por delaminación o esfacelo, en dos capas celulares: 1) el epiblasto, células de la porción dorsal con características epiteliales y que poseen membrana basal; 2) el hipoblasto, capa adyacente a la cavidad blastocelómica de células cuboideas (98, 99)

Al proliferar el epiblasto se van creando lagunas líquidas intercelulares que tras ir confluyendo, van desplazando a un grupo de células hacia el exterior. Este grupo de células se diferenciarán en amniocitos (100, 101). Hacia el día 9 postfecundación células hipoblásticas comienzan a migrar y a tapizar la superficie de la vesícula blastocelómica. Esta capa hipoblástica constituirá el endodermo extraembrionario. La vesícula creada debajo de este endodermo es el saco vitelino primario (16, 98). Hacia los 11 días, se puede identificar el mesodermo extraembrionario que se origina a partir de las porciones más distales del embrión y que comienza a rodear todas las estructuras derivadas del embrioblasto entre el endodermo y el citotrofoblasto (98). Se ha sugerido que la cavidad extracelómica se forma como consecuencia de la ruptura del mesodermo extraembrionario por su incapacidad para seguir la rápida expansión del citotrofoblasto dentro de la decidua materna (origen trofoblástico) (102). Sin embargo, otros autores

sugieren que es la coalescencia de múltiples lagunas intercelulares lo que crea la cavidad extracelómica dentro del mesodermo (origen mesodérmico) (97, 98, 103).

Durante la 3ª semana del desarrollo, el saco vitelino secundario queda configurado como una vesícula que protruye de la porción ventral del embrión. Su pared esta compuesta por mesodermo y endodermo extraembrionario (104). Después de los sucesivos plegamientos tridimensionales del embrión se comienzan a crear estructuras intraembrionarias. La constricción de los planos embrionarios a nivel de la base del saco vitelino secundario da lugar al conducto vitelino. La progresiva elongación del conducto vitelino hace que eventualmente el saco vitelino secundario aparezca como un globo inmerso en la cavidad extracelómica unido por este conducto a la pared abdominal del embrión (86, 105-107). Mucho más caudal al saco vitelino secundario se unen los tejidos mesodérmicos embrionarios y extraembrionarios y, dentro de este tallo mesodérmico se sitúa la segunda vesícula de origen hipoblástico llamada el alantoides. Finalmente, tanto el conducto vitelino como el alantoides suponen estructuras vestigiales más allá del primer trimestre y el tallo de conexión formará el cordón umbilical (**Figura 11**) (108, 109).

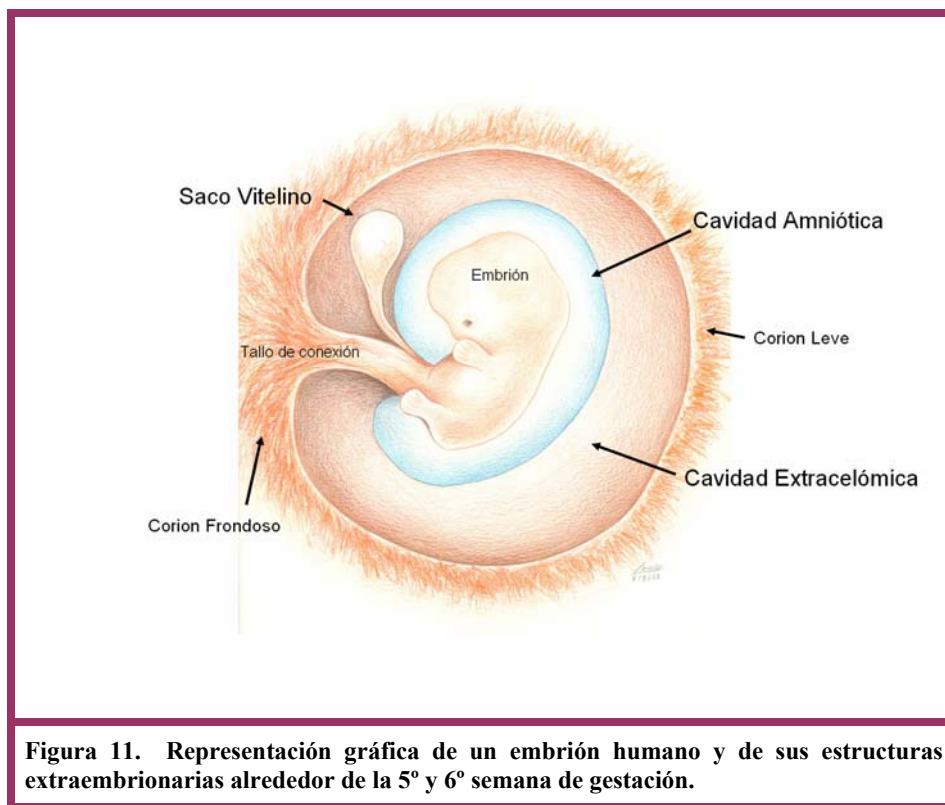


Figura 11. Representación gráfica de un embrión humano y de sus estructuras extraembrionarias alrededor de la 5ª y 6ª semana de gestación.

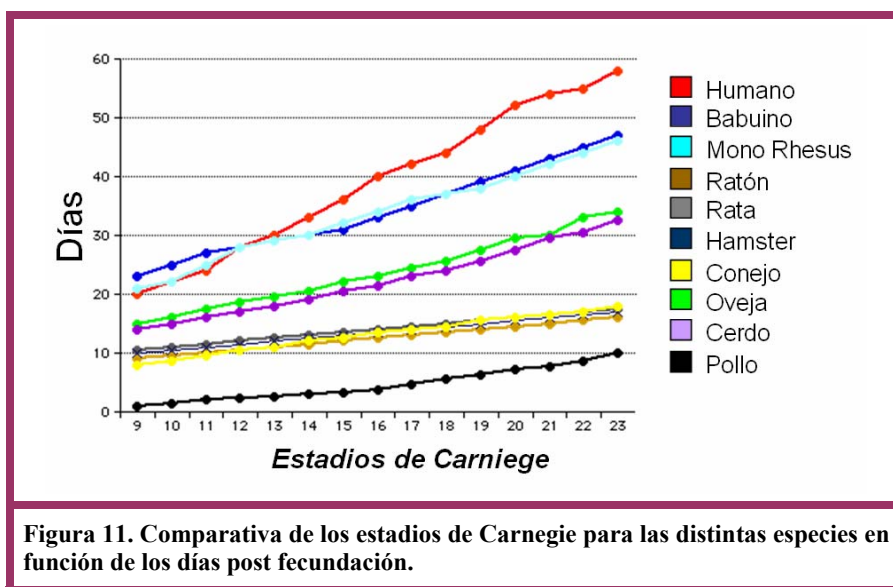
Las células citotrofoblásticas después de una serie de cambios estructurales forman el tejido corial. El tejido corial establece la comunicación entre el saco gestacional y la decidua materna (96, 110). Inicialmente, se forman las vellosidades coriales primarias que están compuestas por columnas de citotrofoblasto rodeadas de una fina capa de sincitiotrofoblasto. Más tarde, el mesodermo extraembrionario se introduce entre las células citotrofoblásticas dando lugar a las vellosidades secundarias. Dentro de este soporte mesenquimal se formarán los vasos sanguíneos placentarios que se serán los encargados de dar funcionalidad a las vellosidades que pasan a llamarse terciarias (111, 112). Desde la 6ª semana de gestación, pueden observarse vellosidades de tipo primario, secundario y terciario y conforme avanza el embarazo, el porcentaje de estas últimas es mucho más importante. A medida que el saco amniótico crece y contacta con las vellosidades coriales, estas degeneran y forman el corion leve. Las vellosidades asociadas a la decidua basal y que no están en contacto con el saco amniótico, proliferan y forman el corion frondoso o placenta definitiva (**Figura 11**) (16).

2.8. Estadios de Carnegie del desarrollo embrionario

En la actualidad, todos y cada uno de los acontecimientos que tienen lugar en el embrión, durante el desarrollo, pueden seguirse mediante los estadios de Carnegie (16, 98). Estos estadios, son el resultado de los estudios anatomopatológicos llevados a cabo desde principios del siglo pasado por Franklin Mall en el Department of Embryology at the Carnegie Institute of Washington, en una importante colección de 813 embriones humanos, así como de otras especies. Este autor, utilizando la aparición de eventos morfológicos internos y externos, a su vez, embrionarios o extraembrionarios, conforme avanza la gestación, encontró una forma de describir el desarrollo embriológico en 23 estadios a partir de la fecundación. En la siguiente tabla, se describen cada uno de los Estadios de Carnegie así como su relación con los días tras la fecundación, el tamaño del embrión, las imágenes embrionarias al microscopio así como cada uno de los eventos característicos de cada periodo.

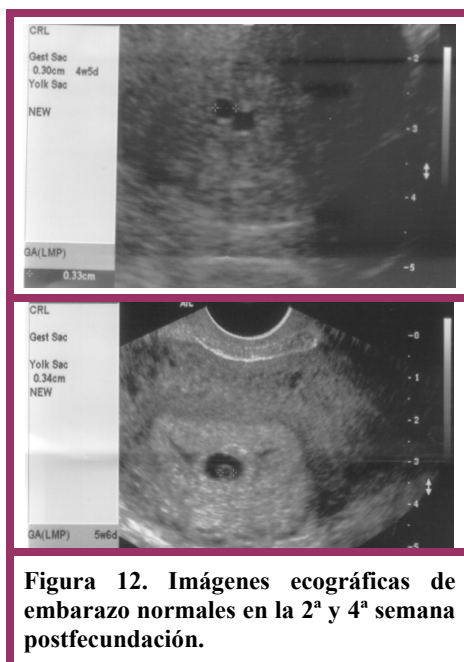
Según los estudios de O'Rahilly, Luekett y otros autores, los eventos morfológicos que aparecen en el desarrollo embriológico humano, característicos de los Estadios de Carnegie, pueden observarse en los embriones de otros animales vertebrados haciendo comparables el desarrollo embrionario en dichas especies (97,

113). La **figura 11** representa el análisis comparativo de los estadios de Carnegie en diferentes especies. Los datos están basados en la comparativa de días aproximados, dada la variabilidad que se puede encontrarse en el desarrollo normal de cada especie.



2.9. Ecografía a lo largo del primer trimestre de gestación

La introducción de la ecografía transvaginal ha facilitado la visualización de los



12)(117, 122).

cambios fisiológicos acaecidos durante el periodo menstrual y el primer trimestre de gestación. De tal manera que puede diagnosticarse y seguirse el lugar donde ocurre la implantación, determinar la corionicidad así como el número de embriones, su morfología y datar de una forma más exacta el período gestacional durante el primer trimestre (114-121).

El saco gestacional puede ser detectado entre los días 15 y 21 post fecundación como una imagen econegativa esférica de 2-3 mm de diámetro, dentro de la pared endometrial (**Figura**

El saco vitelino es la primera estructura inequívocamente embrionaria que puede

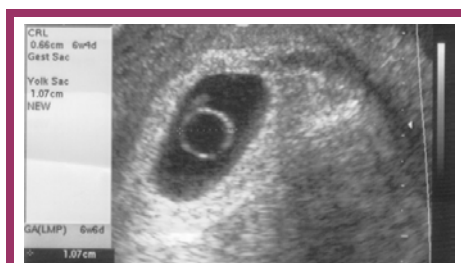


Figura 13. Saco vitelino anormal (>7mm) dentro del saco gestacional durante la semana 5 postfecundación en un embarazo que terminó en aborto espontáneo.

ser visualizada por ecografía a partir de la 3ª semana post fecundación, flotando en el espacio extracelómico dentro del saco gestacional (**Figura 13**) (120, 123). La imagen característica es un “anillo” de 3 a 6 mm. En su crecimiento, el saco vitelino alcanza su diámetro máximo hacia la semana 7 de gestación y mantiene este tamaño hasta la semana 10, que es cuando comienza a involucionar para desaparecer ecográficamente

hacia la semana 12 (124-126). Los estudios con ultrasonidos realizados de manera prospectivas, durante el primer trimestre, para analizar el valor pronóstico de las mediciones, tanto del saco gestacional como del saco vitelino, han puesto de manifiesto multitud de resultados, algunos de ellos contradictorios (127-129). Existe consenso en señalar que la ausencia de saco vitelino, en presencia de un saco gestacional mayor de 20 mm, o la presencia de un saco vitelino con un diámetro mayor a 7 mm, se ven asociados con un mayor riesgo de pérdidas de embarazo (**Figura 13**) (127).

También hay que resaltar, que mediante ecografía tridimensional y Doppler color se ha descrito el volumen y la vascularización del saco vitelino durante el primer trimestre, aunque en este tipo de exploraciones, se ha advertido de la posibilidad iatrogénica sobre la gestación, debida al incremento de temperatura local tras incidir con el Doppler color de forma prolongada sobre la pared de saco vitelino (109, 127, 130).

El saco amniótico no se visualiza claramente por ecografía hasta la 6ª semana postfecundación. Aparece como una

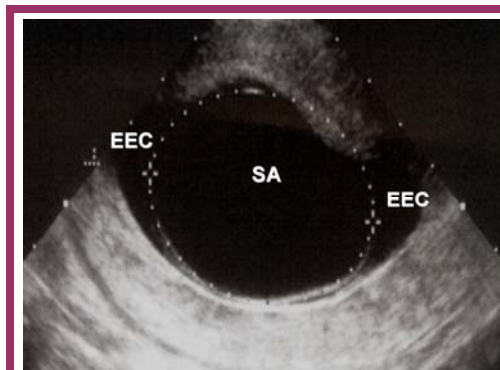
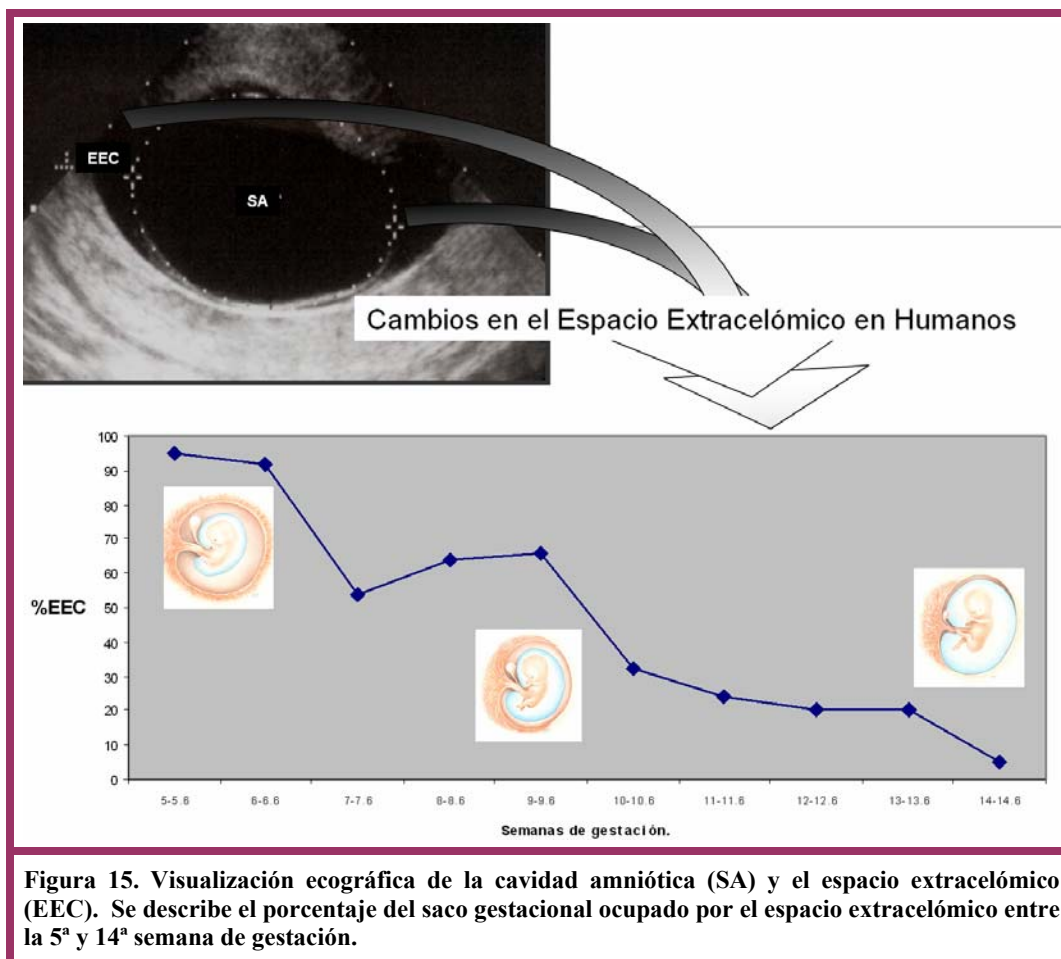


Figura 14. Imágenes ecográficas de del saco gestacional donde se define el saco amniótico (SA) y el espacio extracelómico (EEC) en la 7ª semana postfecundación.

membrana que se expande alrededor del embrión y termina por obliterar la cavidad extracelómica al final del primer trimestre (**Figura 14**) (131-134). Para acumular líquido, el saco amniótico tiene que ser prácticamente impermeable. Esto lo sugieren estudios que han demostrado que a partir de las 12ª semana postfecundación, debido a la apertura del sistema digestivo fetal al líquido

amniótico, la concentración de alfa feto proteína aumenta progresivamente en el líquido amniótico (134). La expansión del saco amniótico entre la 5ª y 14ª semana de gestación correlaciona con la expansión de la superficie embrionaria. Más allá de la 12ª semana de gestación la circulación feto placentaria, el sistema urogenital, el aparato digestivo y los pulmones fetales son los mayores determinantes de la producción de líquido amniótico (134, 135).

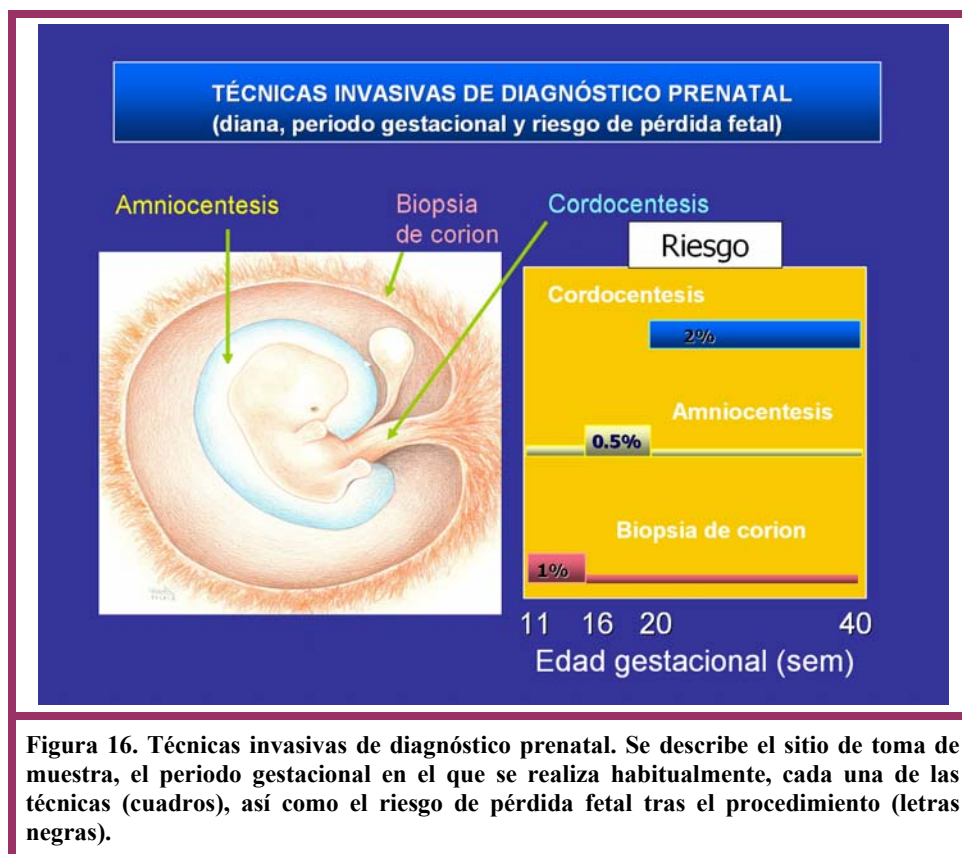
El espacio extracelómico puede visualizarse ecográficamente a lo largo del primer trimestre de gestación, como el espacio entre la superficie corial, la cavidad amniótica y el embrión en desarrollo (136). Antes de la 8ª semana de embarazo ocupa más de la mitad del saco gestacional. Posteriormente, y debido al rápido crecimiento de la cavidad amniótica, la cavidad extracelómica va disminuyendo de tamaño y termina por desaparecer más allá de la 14ª semana (134) (**Figura 15**).



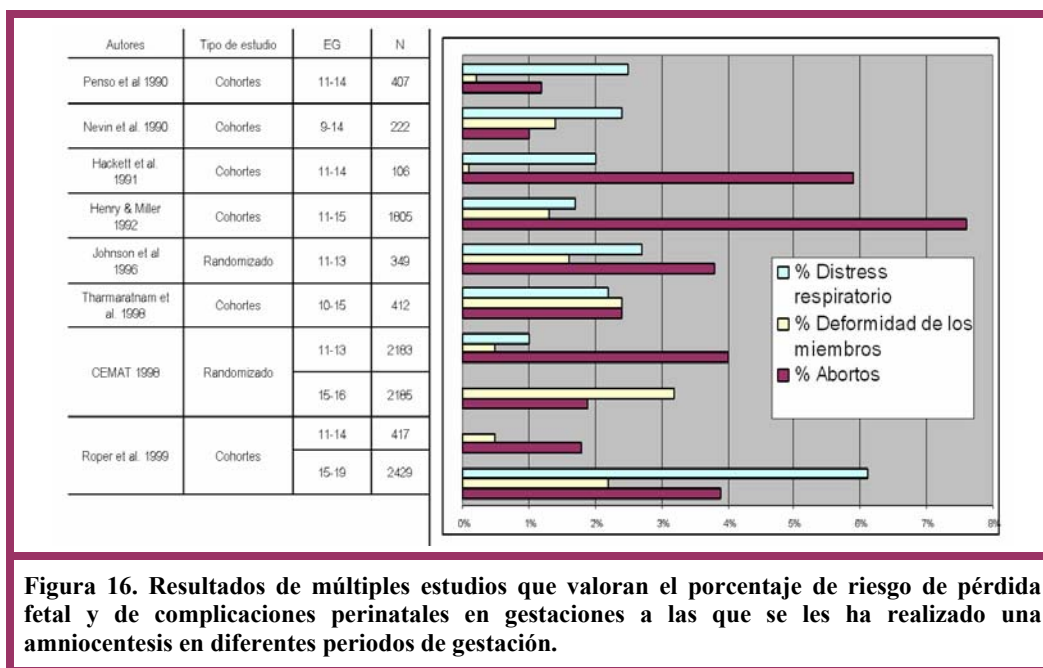
2.10. Breve descripción de los procedimientos utilizados actualmente para el diagnóstico y tratamiento prenatal en embriones preinmunes

Los avances en genética clínica, las técnicas de diagnóstico prenatal por imagen, el desarrollo de marcadores biológicos en suero materno y los procedimientos diagnósticos ecoguiados a partir de la 10ª semana de gestación han proporcionado la base que convierte al feto en paciente (132, 134, 137, 138).

Todos los procedimientos prenatales invasivos incrementan el riesgo de complicaciones del embarazo, así como la posibilidad de lesión fetal o alteraciones en su desarrollo (139, 140) y por tanto, es importante un consejo genético integral que informe de manera objetiva de las múltiples opciones, con ventajas y desventajas, con las que cuenta la paciente. Se deben analizar los riesgos en función de las semanas de gestación, de los resultados del screening bioquímico y de la experiencia en una u otra técnica que tenga el operador (**Figura 16**).



La precocidad en el diagnóstico prenatal facilita a los padres el tomar una actitud terapéutica ante un feto afecto. Sin embargo, no se recomiendan realizar amniocentesis anteriores a la 14ª semana de gestación, siendo imposible la realización de cordocentesis en este periodo (**Figura 16**) (141-144).



A diferencia de la amniocentesis precoz, no se ha demostrado que exista un mayor porcentaje de complicaciones perinatales o pérdidas fetales, en los casos en los que se ha realizado biopsia de corion antes de la 12ª semana de gestación (145, 146) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resultados de múltiples estudios que valoran el porcentaje de complicaciones perinatales en gestaciones a las que se les ha realizado biopsia de corion en diferentes periodos de gestación.

Tipos de estudio	Fuentes	Nº de Casos	Edad gestacional	% Deformidad de los miembros
Estudios multicéntricos	GIDEF 1993	2759	6-16	1.49
	Hsieh et al 1995	78742	7-12	0.29
	Froster et al 1996	138966	6-20	0.6
Estudios de cohortes	Firth et al 1991	289	8-10	1.73
	Blakemore et al 1994	4105	8-12	0.84
	Wapner et al 1996	20040	6-20	0.03

Otras técnicas, como la embrio-fetoscopia aún se encuentran en fase

experimental. En la embrioscopia, el sistema óptico se introduce en el espacio extracelómico bajo guía ecográfica, evitando la membrana amniótica, por lo que se limita su aplicación entre la 8ª y la 11ª semanas de embarazo (147). En un periodo posterior la fetoscopia, durante el segundo y tercer trimestre, permite una visión directa del feto mediante un endoscopio de fibra óptica que puede conducirse hasta la cavidad amniótica a través de una aguja de 20-21 g. a través del amnios (148, 149). Existen varios puntos problemáticos en cuanto a la aplicación de estas técnicas, las dificultades técnicas, la necesidad de perfeccionamiento de los equipos ópticos, el riesgo desconocido de pérdidas gestacionales o complicaciones perinatales. Por ejemplo, queda por definir el riesgo potencial de lesión de la retina fetal en formación (148, 149).

2.10.1. Celocentesis

Durante la década de los 70, estudios realizados durante el segundo y tercer trimestre de gestación demostraron los cambios que ocurren en las características físico-químicas del líquido amniótico y de que forma se relacionaban con los cambios que acontecían a nivel del suero materno (150, 151). Amniocentesis hechas antes de la 12ª semana postfecundación, sin embargo, proporcionaron resultados contradictorios en cuanto a la composición del líquido amniótico debido a la contaminación con líquido extracelómico (102, 152). La aparición de las sondas ecográficas transvaginales facilitó el reconocimiento de las estructuras existentes dentro del saco gestacional y, más concretamente, delimitar la membrana amniótica (132, 134, 153). En 1991, surgieron a la par dos equipos en Londres que comenzaron a describir datos bioquímicos provenientes del espacio extracelómico (154, 155). Ambos grupos coincidieron en que el líquido del espacio extracelómico no era una gelatina y podía ser aspirado entre la 6ª y 12ª semana postfecundación mediante abordaje vaginal. Desde entonces, los cambios ecográficos del espacio extracelómico han sido descritos tanto en embarazos humanos como en el modelo babuino (*Papio Anubis*) (**Figura 17**) (101, 134, 137).

En estos animales el momento más seguro para realizar la celocentesis ha sido definido

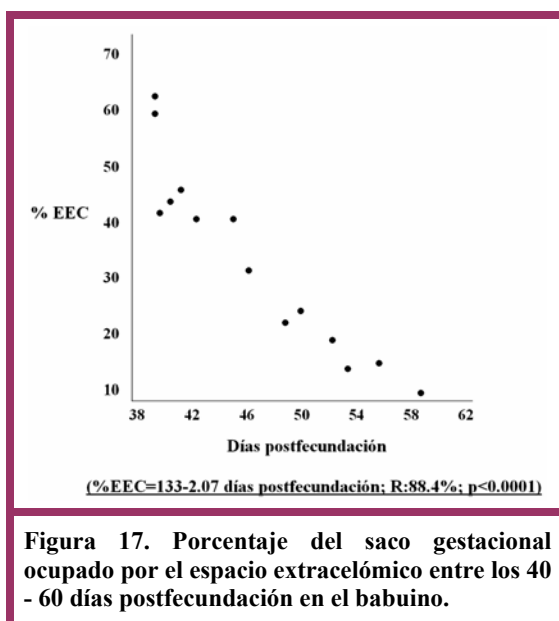


Figura 17. Porcentaje del saco gestacional ocupado por el espacio extracelómico entre los 40 - 60 días postfecundación en el babuino.

en torno a los 40 días postfecundación (101, 137). Para poder realizar el procedimiento se requiere:

1. Una gran experiencia en la exploración ecográfica durante el primer trimestre de gestación y en la realización de otras técnicas invasivas ecoguiadas, siguiendo seguir las recomendaciones habituales incluyendo la determinación del grupo sanguíneo materno.

2. Como regla general debe

planificarse la entrada de la aguja con un trayecto sencillo, evitando la placenta y sobre todo que proporcione un margen de seguridad.

3. La preparación para garantizar un procedimiento rápido, seguro y efectivo.
4. Un equipo entrenado, que pueda coordinar cada paso (obtención, transporte y procesamiento de la muestra) dentro del procedimiento.

Los resultados publicados en humanos, realizados en gestaciones humanas durante el primer trimestre, en mujeres que habían decidido interrumpir su gestación, fueron obtenidos tras el abordaje vaginal. Sin embargo, la celocentesis puede realizarse tanto por la vía transvaginal como la transabdominal. Esta última, esta siendo explorada en primates (156, 157). La longitud de la aguja o trocar requerida depende de la vía de acceso, utilizando agujas de 20-22 g en celocentesis transabdominales y de 17-20 g en transvaginales. La punción debe hacerse bajo las mejores condiciones de esterilidad. Todos los estudios animales han requerido sedación de los mismos, pero en el caso de humanos, no se ha requerido ningún tipo de analgesia-anestesia. Al igual que otros procedimientos ecoguiados, se puede utilizar el método de operador único (una mano sostiene la aguja y la otra el transductor) o de dos operadores; en el que un operador controla la imagen ecográfica, mientras que otro se encarga de la punción, retira el estilete de la aguja, fija la jeringa y aspira o inyecta. La frecuencia cardíaca fetal debe ser revisada y registrada constantemente. Tras retirar la aguja, el sitio de punción

uterina debe ser observado ecográficamente para descartar sangrado (156, 157).

La evaluación del riesgo asociado a un procedimiento invasivo es compleja, ya que toda gestación presenta un riesgo basal de pérdida fetal y de complicaciones perinatales que aumentan en presencia de patología fetal. En general, como para cualquier procedimiento prenatal invasivo, se piensa que los principales riesgos de la celocentesis están relacionados con la rotura prematura de membranas, hemorragia, infección y muerte fetal (158, 159). Se tiende a considerar como pérdida relacionada al procedimiento la que ocurre en los primeros días tras el procedimiento. El porcentaje de pérdida gestacional, en humanos, tras celocentesis por vía vaginal es un tema controvertido, encontrándose una amplia variedad en los resultados (3-20%) (160-162). Por el contrario, los estudios realizados en primates no humanos, en los que se ha seguido el embarazo hasta el término del mismo, han encontrado un riesgo aproximado de un 3% de pérdidas gestacionales (101). Se están estudiando los riesgos secundarios de la celocentesis por vía transabdominal y para el momento en el que se redacta esta Memoria, al parecer, los resultados obtenidos resultan esperanzadores (156, 157). Además, debe tenerse en cuenta que estudios ecográficos seriados, tanto del embrión, como de las estructuras extraembrionarias, han permitido cuantificar el riesgo basal de pérdida fetal. Resultados de un estudio prospectivo realizado en 232 mujeres con test de embarazo positivo, sin antecedentes de sangrado vaginal y con presencia de saco gestacional, demostró una tasa de pérdida fetal de un 11,5%. En los casos en los que además, pudo definirse un embrión con una longitud cráneo-caudal de 5 mm la tasa de aborto fue de un 7,2%, de 3,3% cuando los embriones midieron entre 6-10 mm y de 0,5% cuando el embrión midió más de 10 mm (7 semanas postfecundación). Finalmente, aún queda por definir el potencial diagnóstico y terapéutico que tendría la celocentesis y por este motivo, promover la investigación en primates no humanos, antes de valorar su uso experimental o clínico en humanos (156, 157).

3. OBJETIVOS

La tolerancia inmunológica que presenta el embrión durante las primeras semanas del desarrollo, permite trasplantar células madre hematopoyéticas, alogénicas o *xenogénicas*, de un donante, de forma que se implanten quimeras hematopoyéticas estables en el receptor.

El trasplante de células madre hematopoyéticas al embrión preinmune tendría las siguientes ventajas:

- El estado de tolerancia, a corto plazo, haría posible el trasplante y, a largo plazo, descartaría la necesidad de tratamiento inmunosupresor.
- El tejido hematopoyético del huésped, durante este periodo, se encontraría “vacío” y de esta forma, las células del donante anidarían sin la necesidad de tratamiento mieloablativo previo al trasplante.
- El trasplante en un período embrionario en el que el sistema hematopoyético del huésped se está expandiendo, facilitaría el desarrollo de las quimeras hematopoyéticas establecidas.
- La terapia génica, mediante la introducción de células sanas en individuos afectados de una enfermedad congénita, se realizaría antes del desarrollo del fenotipo patológico.

Basado en estos datos, se realiza el presente trabajo, cuyo objetivo general es conocer, utilizando como modelo animal el babuino, la posibilidad de trasplantar células madre hematopoyéticas CD34+, procedentes de la sangre del cordón umbilical de humanos, en el espacio extracelómico vía celocentesis ecoguiada. De forma específica se pretende:

1. Establecer la correlación entre el número de células hCD34+, aisladas por métodos inmunomagnéticos, procedentes de la sangre del cordón umbilical, el volumen de sangre recogido y las variables clínicas obstétrico-neonatales.
2. Determinar la capacidad de expansión y diferenciación *ex vivo* de las células hCD34+, utilizando cultivos dependientes de medio y citocinas.
3. Estudiar de forma comparativa la tasa de proliferación y diferenciación celular, así como el número de células hCD34+ tras la expansión y nueva selección por métodos inmunomagnéticos.
4. Establecer la capacidad de supervivencia de las células hCD34+ en el líquido extracelómico del babuino, así como el fenotipo de las células supervivientes, en cada una de las condiciones de cultivo estudiadas.
5. Evaluar la capacidad diagnóstica, en muestras con probable *xenoquimerismo* humano-babuino, del grupo sanguíneo, el cariotipo, la citogenética molecular, los estudios por citometría de flujo y los estudios genómicos.

6. Determinar la validez del modelo animal “babuino” para realizar estudios de diagnóstico prenatal y de trasplante *in utero* de células madre hCD34+ durante un periodo preinmune vía celocentesis ecoguiada. Para ello será preciso alcanzar los siguientes objetivos secundarios:
 - a. Comparar la evolución de los parámetros ecográficos del desarrollo gestacional del humano y el babuino, en diferentes estadios del embarazo.
 - b. Describir los resultados perinatales de gestaciones humanas a término, que no presentaron ningún tipo de complicación en el momento del parto, y de gestaciones babuinas a término y sanas, que viven en condiciones de semi libertad.
 - c. Establecer la correlación entre la edad gestacional al parto y el peso neonatal de los recién nacidos babuinos.
 - d. Describir la curva de crecimiento ponderal de los neonatos babuinos durante los primeros seis meses de vida.
 - e. Determinar si existen diferencias en la curva de crecimiento ponderal en función del sexo del neonato babuino durante los primeros seis meses de vida.
 - f. Validar los resultados hematológicos obtenidos en babuinos en distintos estadios del embarazo, utilizando los valores de referencia habitualmente empleados en humanos.
 - g. Determinar la distribución de algunas hormonas y citocinas en la sangre materna de babuino gestante alrededor de los 40 días postfecundación, antes y después de la celocentesis.
 - h. Determinar la posibilidad de realizar estudios citogenéticos en las células procedentes del espacio extracelómico del babuino.
7. Diseñar un catalogo de moléculas, medidas en muestras pareadas de sangre materna y líquido extracelómico de gestaciones humanas, durante el primer trimestre del embarazo, y calcular el gradiente existente entre ambos compartimentos para cada molécula.
8. Valorar la influencia del grupo sanguíneo, número y porcentaje de células madre hematopoyéticas hCD34+, y de células CD3+ inyectadas, sobre el riesgo de aborto, tras el trasplante de células madre hematopoyéticas en el espacio extracelómico de los babuinos gestantes.

9. Evaluar la posibilidad de inyectar, de forma seriada, durante el primer y segundo trimestre de gestación, células hCD34+ en babuinos gestantes.
10. Describir las variables: edad gestacional y peso de los neonatos babuinos, a los que se trasplantaron células hCD34+ *in utero* en relación al grupo control de neonatos babuinos.
11. Determinar la presencia de *xenoquimerismo* humano-babuino en los neonatos babuinos a los que se trasplantan células hCD34+ *in utero*.

4. SUJETOS DE ESTUDIO Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio. Sujetos y periodo del estudio

Para la consecución de los resultados presentados en esta Memoria se han realizado una serie de estudios con diferente diseño, que se explican a continuación, considerando que se ha trabajado, tanto en humanos, como en animales de experimentación:

4.1.1. Estudios en humanos

1. Estudio transversal en 8.876 partos atendidos en dos hospitales de Amarillo (Texas, EE.UU.), entre enero de 2.001 y diciembre de 2.002, con edad gestacional superior a 22 semanas de embarazo. Se seleccionaron 5.786 nacidos a término (37-40 semanas cumplidas de embarazo) de gestaciones únicas y sin complicaciones intraparto como grupo control. En este grupo, se analizaron las variables perinatales de edad gestacional y peso neonatal, para la creación de normogramas de estudio de dichas variables.

2. Estudio transversal en 45 muestras de sangre de cordón umbilical de la población anterior, con una edad gestacional en el momento del parto de $39 \pm 1,7$ semanas (rango de 37– 41 semanas), de las que se obtienen células madre hematopoyéticas CD34+ (hCD34+) y plasma. Se describen las variables clínico-analíticas tanto de la madre como de los recién nacidos, así como las correlaciones entre las distintas variables registradas.

3. Estudio longitudinal prospectivo de proliferación y diferenciación celular tras cultivar las células hCD34+, aisladas a partir de 5 muestras de sangre de cordón umbilical, de las 45 anteriormente descritas, en diferentes condiciones, con intención de lograr la expansión celular *ex vivo*.

4. Estudio longitudinal prospectivo de las células hCD34+, obtenidas del cordón umbilical de un recién nacido, incubadas en diferentes concentraciones de líquido extracelómico, extraído de un animal de experimentación, y medio de cultivo empleado en los experimentos de expansión *ex vivo*.

Todos los estudios humanos se llevaron a cabo según los criterios establecidos en los protocolos IRB 2041: *Hematopoietic gene therapy*, IRB 1823: *Antepartum and postpartum retrospective chart review* y IRB 3032: *Fetal maternal and placental endocrinology at*

normal term delivery, cuyo investigador principal fue el Dr. Joaquín Santolaya Fórgas y el investigador asociado, el Dr. Juan Antonio León Luis, en el Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Texas Tech Health Sciences Center, Amarillo (Texas, EE.UU.) (ver anexo: Protocolos de estudios en humanos). A cada paciente, se le entregó y explicó un consentimiento informado, que posteriormente firmó, y cuyo contenido se acoge a la normativa sobre la protección de datos de carácter personal, que exige la legislación americana y evaluado de forma favorable, por el Comité Ético de Investigación de la Universidad de Texas Tech Health Sciences Center, Amarillo (Texas, EE.UU.).

4.1.2. Estudios en animales de experimentación

Todos los experimentos se realizaron en babuinos (*Papio Anubis*) procedentes la colonia animal de Fort Reno, pertenecientes a la Universidad de Oklahoma (Oklahoma, EE.UU.).

1. Estudio transversal de 18 animales gestantes, en diferentes edades del embarazo, donde se describen los parámetros ecográficos biométricos y los parámetros hematológicos, útiles en el control del embarazo humano, con el interés de validar el modelo animal babuino, como sustituto del modelo humano, para realizar estudios durante el periodo gestacional y perinatal. Para la consecución de este objetivo, se han tomado en cuenta como grupo control 46 gestaciones humanas cuyo embarazo cursó de forma favorable.
2. Estudio transversal en 49 recién nacidos babuinos a término, entre agosto de 2.001 y agosto de 2.003, en el que se describen las variables perinatales de edad gestacional y peso neonatal en normogramas de estudio. Estos resultados se compararon con los resultados procedentes del estudio de 5.786 recién nacidos humanos a término y sin complicaciones intraparto, descrito en el primer apartado de los estudios en humanos.
3. Estudio transversal en 45 animales de distinta edad (años) y sexo, en los se realizan diferentes métodos de diagnóstico de *xenoquimerismo* (humano-animal) hematopoyético, basados en la detección del grupo sanguíneo (N:45), el cariotipo (N:9) y la hibridación *in-situ* con fluorescencia, con sondas específicas para los cromosomas humanos X e Y (N:32), citometría de flujo y estudios

moleculares utilizando la técnica de PCR para la identificación de genes específicos humanos (N:11).

4. Estudio longitudinal prospectivo del crecimiento de las células del líquido extracelómico, procedentes de 9 animales gestantes entre 36 y 44 días de desarrollo, con la intención de optimizar el diagnóstico prenatal de anomalías citogenéticas.
5. Estudio transversal de 3 muestras pareadas de sangre materna y líquido extracelómico, procedentes de animales gestantes entre 38 y 42 días de desarrollo. Se describe la concentración de distintas hormonas y citocinas en ambos fluidos.
6. Estudio transversal de 7 muestras pareadas de sangre materna, antes y después de la celocentesis, procedentes de animales gestantes entre 38 y 44 días de desarrollo. Se describe la concentración de distintas hormonas y citocinas en ambos momentos.
7. Estudio longitudinal prospectivo en 8 animales gestantes entre 36 y 44 días post fecundación, a los que se les trasplantan células hCD34+ vía celocentesis ecoguiada, y que se someten a un seguimiento desde el inicio del trasplante, en torno a los 120-140 días de gestación, tras el parto, y a los 2-3 meses de vida postnatal, teniendo en cuenta las características de las células hCD34+ trasplantadas (grupo sanguíneo, número de células, y porcentaje de los diferentes fenotipos celulares inyectados).
8. Estudio longitudinal prospectivo en uno de los animales del apartado anterior, en el que se trasplantan por segunda vez células hCD34+, procedentes del mismo cordón, mediante punción de la vena intra-hepática del feto, a los 111 días de desarrollo.
9. Estudio longitudinal prospectivo en 2 animales gestantes entre 38 y 42 días de desarrollo, respectivamente, en los que se sustituye *in vivo* el líquido extracelómico, por medio de cultivo y factores de crecimiento de células hematopoyéticas, utilizado en la expansión *ex vivo* de las células hCD34+.
10. Estudio longitudinal prospectivo en 3 recién nacidos a término, a cuyas madres se les trasplantaron células hCD34+, para la detección de *xenoquimerismo*, tras

el parto, al mes y a los dos meses, utilizando los distintos métodos de detección descritos en el apartado correspondiente a los sujetos de estudio y métodos de esta Memoria.

Todos los estudios en animales de experimentación se llevaron a cabo según los criterios establecidos en el protocolo 03-073, aprobado por el *Institutional Animal Care and Use Committee* de la Universidad de Oklahoma, el 23 de abril de 2.003, cuyo investigador principal fue el Dr. Joaquín Santolaya Forgas y el investigador asociado, el Dr. Juan Antonio León Luis, del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Texas Tech Health Sciences Center, Amarillo (Texas, EE.UU.) (ver anexo: Protocolo de estudio en animales de experimentación).

4.2. Protocolo clínico.

4.2.1. Variables estudiadas en humanos

Los datos pertenecientes a los partos atendidos en los dos Hospitales en Amarillo (Texas, EE.UU.), se obtuvieron de los registros de ambos paritorios. Se anotaron en una ficha individual las siguientes variables de estudio: edad materna en el momento del parto; tipo de gestación: única o múltiple; presencia de patología obstétrica (diabetes gestacional, hipertensión inducida del embarazo, otras) o perinatal (rotura prematura de membrana, malformación congénita, crecimiento intrauterino retardado, otras); edad gestacional; tipo de parto: vaginal o cesárea; peso neonatal; valor del test de Apgar al 1º y 5º minutos; y mortalidad perinatal. Con intención de establecer los normogramas de edad gestacional y peso neonatal en gestaciones únicas a término, tras parto vaginal, y sin patología obstétrico-perinatal, se excluyeron el resto de partos que no cumplían estos requisitos.

Los datos pertenecientes a la madre y el recién nacido, del que se recogió la sangre del cordón umbilical, fueron registrados en un formulario clínico. Este formulario constaba de 2 hojas en las que se ordenaron todas las variables a estudio: información general de filiación, historial médico de la madre y sus familiares, datos relevantes al control gestacional, grupo sanguíneo materno, datos referentes al parto, así como los datos neonatales más relevantes (**Figura 18**).

Figura 18. Formulario clínico: Hoja de recogida de datos en los estudios en humanos.

Maternal Age _____ Weight(KG or Pounds) _____
 European _____ Hispanic _____ African _____ Native American _____
 Other _____

Medical History

GA at delivery _____ (dates by US: YES _____ NO _____)
 G _____ P _____ Full term _____ Premature _____ Ab induce _____ Ab Spontaneos _____
 Ectopics _____ Multiples Births _____ Living _____

Past Medical History

Diabetes(type) _____ Hypertension _____ Heart Disease _____
 Autoimmune Disease _____ Kidney Disease _____ Neurologic/epilepsy _____
 Psychiatric _____ Thyroid Disfuncton _____ Pulmonary Disease _____
 Tobacco _____ Alcohol _____ Drugs _____
 Comments: _____

Relevant Family History

Diabetes _____ Hypertension _____ Congenital anomalies _____
 Other _____

Sonographic History

EDD ____/____/____
 Level II: NL _____ ABNL _____ : BPP _____ (last Visit)
 Twins YES _____ NO _____

Labs History: Maternal Blood type _____

	Result	MoM	Risk Assessment (at mid trimester)
AFP	_____	_____	OSB RISK _____
uE3	_____	_____	Down Syndrom RISK: _____
hCG	_____	_____	Age alone _____
DIA	_____	_____	Karyotype _____

Figura 18. Formulario clínico, continuación: hoja de recogida de datos en los estudios en humanos.

HbA1c at first prenatal visit _____
 O'sullivan: 1 hour _____ oGTT date ____/____/____ FBS ____ 1H ____ 2H ____ 3H ____

THERAPEUTIC INTERVENTIONS DURING PREGNANCY

Diet:

Insulin schedule: *Calculation of dose:* Units daily insulin _____

AM-NPH _____ PM-NPH _____

AM-Regular _____ PM Regular _____

OTHER MEDICATIONS LIST:

1 _____ 2 _____ 2 _____
 Other _____

Delivery:

Vaginal: Spontaneous: _____ Induced _____

Cesarean _____ elective _____ Emerg. _____

Date: ____/____/____

Neonatal data

Gender _____ Weight: _____ Apgar _____ Cord gases _____

GA delv _____ Blood Type: _____ Hb _____ Hct _____

CBC: _____

Other Comments; suggestions;

Jasón Gooch M.D

*Joaquín Santolaya-Forgas MD,PhD.
 Genetics*

4.2.2. Variables estudiadas en los animales de experimentación.

Los datos de cada animal se registraron en un protocolo de trabajo. Este protocolo constaba de 4 hojas en las que fueron ordenadas todas las variables a estudio: información general de filiación del animal, historial médico del babuino gestante, datos relevantes al control gestacional, datos ecográficos más relevantes, registro digital de los parámetros ecográficos, y procesamiento de los registros digitalizados. En la segunda hoja, se recogieron los datos inmediatos a la celocentesis u otros procedimientos invasivos. En la tercera y cuarta hoja, se recogieron los datos a las 24 y 72 horas después de la celocentesis u otros procedimientos invasivos realizados en cada animal (**Figura 19**).

Figura 19. Formulario clínico: Hoja de recogida de datos en los estudios en animales de experimentación

Estudio en Babuinos. Oklahoma University. Pág.				
DATOS DEL FILIATORIOS DEL BABUINO GESTANTE				
NOMBRE DE LA MADRE INUMERO	PESO	NOMBRE DEL PADRE INUMERO		
DIAS DE GESTACION	ESTADO	COMENTARIOS		
COMENTARIOS ADICIONALES				
ESTUDIO ECOGRÁFICO INICIAL				
SACO GESTACIONAL	LCC	SACO AMNIOTICO	SACO VITELINO	LATIDO CARDIACO
ALMACENADO EN VIDEO	TIEMPO	NUMERO CINTA	DIGITALIZACION	COMENTARIOS
COMENTARIOS ADICIONALES				
EXPERIMENTO NUMERO..... NOMBRE- NUMERO DEL ANIMAL.....				

Estudio en Babuinos. Oklahoma University. Pág.				
EXTRACCIÓN DE SANGRE PRE-CELOCENTESIS				
VOLUMEN	PROCESADO EN	COMENTARIOS		
CELOCENTESIS (EXTRACCIÓN DE LIQUIDO EXTRACELÓMICO, TRASPLANTE DE CELULAS HEMATOPOYETICAS)				
NUMERO MUCOTTA DE LABORATORIO	NUMERO DE CELULAS	GRUPO SANGUINICO	VOLUMEN	COMENTARIOS
VOLUMEN DE LIQUIDO EXTRACELÓMICO EXTRAÍDO.				
LATIDO CARDIACO POST CELOCENTESIS.				
EXPERIMENTO NUMERO..... NOMBRE- NUMERO DEL ANIMAL.....				

Figura 19. Formulario clínico, continuación: hoja de recogida de datos en los estudios en animales de experimentación

Extracción de Sangre Post-Celocentesis			Estudio Ecoográfico tras 24 y 72 Horas Post-Celocentesis				
VOLUMEN	PROCESADO EN	COMENTARIOS	SACO OESTACIONAL	LCC	SACO AMNIOTICO	SACO VITELINO	LATICO CARDIACO
COMENTARIOS ADICIONALES			COMENTARIOS ADICIONALES				
Extracción de Sangre tras 24 horas Post-Celocentesis							
VOLUMEN	PROCESADO EN	COMENTARIOS					
COMENTARIOS ADICIONALES							
EXPERIMENTO NUMERO..... NOMBRE - NUMERO DEL ANIMAL.....			EXPERIMENTO NUMERO..... NOMBRE - NUMERO DEL ANIMAL.....				

4.3. Técnicas de laboratorio

4.3.1. Extracción y procesamiento de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos. Obtención de las células mononucleares y plasma sanguíneo

Tras el parto por vía vaginal o cesárea, e indistintamente antes o después del

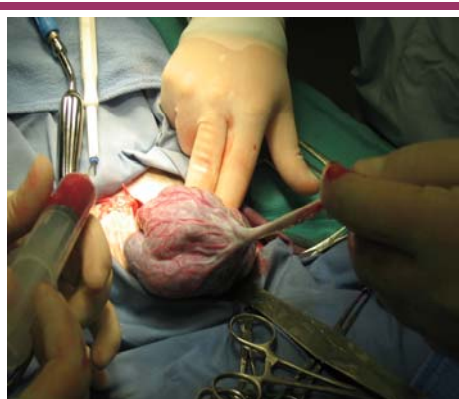


Figura 20. Extracción de la sangre del cordón umbilical mediante método abierto tras cesárea.

alumbramiento placentario, la sangre se recogió por punción estéril de la vena umbilical, inmediatamente después del clampaje del cordón, mediante el aspirado con jeringuillas de 20 ml, en tubos de vidrio con 10 ml de anticoagulante EDTA (**Figura 20**). Cuando se consideró necesario, se realizó una segunda punción cerca de la inserción placentaria del cordón umbilical, para recoger la sangre remanente en el sistema vascular placentario. La sangre se procesó en el momento de la recogida o en las 6 horas posteriores al parto, conservándose a 4°C.

Tanto el plasma, como las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación en un gradiente de densidad. La sangre se diluyó 1:1 en un tampón fosfato-salino (150 mM ClNa, pH 7,2) (PBS) estéril, y se depositó en tubos de 10 ml, con Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Suecia).

Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 minutos a 24°C, y tras ello se recogió el plasma (hasta 9 ml/cordón), que se congeló directamente a -70°C, y la banda correspondiente a las células mononucleares (linfocitos, monocitos, células natural killer o NK, células progenitoras y otras).

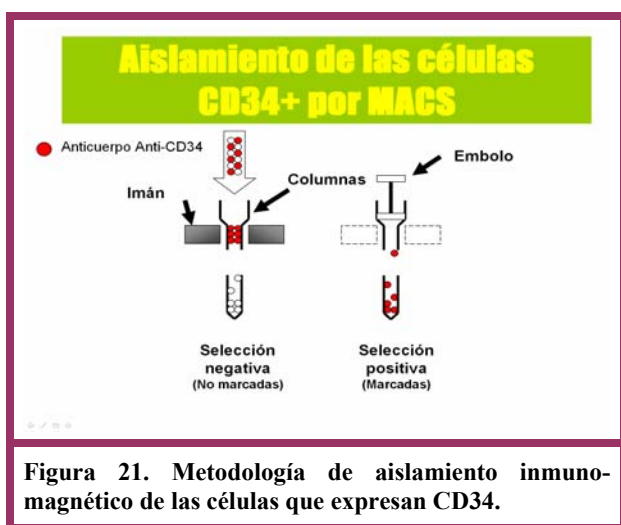
Las células mononucleares se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 (Gibo, Invitrogen Corporation), y finalmente, se resuspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente testado (FBS) (HyClone, Berbio, USA), 50 U/ml de penicilina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania) y 50 U/ml de gentamicina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania). El número total de células obtenidas se cuantificó a partir de una alícuota de 10 µl, en una cámara de *Neubauer* y por microscopia óptica.

4.3.2. Extracción y procesamiento del suero sanguíneo

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de vidrio seco para la obtención del suero. Se mantuvieron a temperatura ambiente, y se procesaron durante las 6 horas siguientes a la extracción, centrifugándose a 3.500 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenido el suero, se congeló inmediatamente para su conservación a -70°C .

4.3.3. Aislamiento y criopreservación de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos. Técnica de separación inmunomagnética

Una vez aisladas las células mononucleares procedentes de las muestras de sangre de cordón umbilical, se procedió al aislamiento de las células que expresan el antígeno CD34, mediante un sistema inmunomagnético de selección directa (MACS), para conseguir



adecuadas tasas de recuperación y pureza celular. La separación inmunomagnética se realizó por selección de las células marcadas con un anticuerpo anti-CD34 (selección positiva), en dos pasos consecutivos, para asegurar especificidad de unión, y en un campo magnético de alta intensidad, empleando CD34 Cell Isolation Kit MicroBeads (Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE.UU.), en columnas MiniMACS MS+ (MS Separation

Column, Miltenyi Biotec) (**Figura 21**).

Las células seleccionadas se recogieron en el tampón (500 ml PBS + 372,2 mg EDTA + 2,5 g BSA) empleado para la separación, en un volumen final de 2ml, del que se tomó una alícuota de 10 μl para cuantificar el número total de células obtenidas, por microscopia óptica.

Las células se resuspendieron en medio de congelación, compuesto por FBS con 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma, Sigma-Aldrich, Alemania), y se guardaron a -70°C hasta su utilización. Antes de su empleo, las células se descongelaron y contaron. La viabilidad celular, establecida mediante el criterio de exclusión con azul tripán, fue superior al 90% (ver anexo: Protocolo de separación inmunomagnética de las células CD34+).

Previo a su criopreservación, la pureza de la fracción que contenía las células CD34+, se estableció mediante citometría de flujo (ver apartado 4.3.5, de esta sección), en torno a un 60% - 90%. Para ello, las células se incubaron con la combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD34 conjugado con FITC/ anti-CD133 conjugado con PE/ anti-CD45 conjugado con ECD (Beckman Coulter), para identificar la población de progenitores hematopoyéticos.



4.3.4. Cultivos celulares

4.3.4.1. Cultivos de expansión *ex vivo* de las células CD34+ aisladas del cordón umbilical

Se cultivaron 5 muestras de células humanas CD34+ (hCD34+) procedentes de sangre de cordón umbilical, seleccionadas por MACS. Las células CD34+ se cultivaron a una concentración de $1,25 \times 10^5$ células en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibo, Invitrogen Corporation) suplementado con 10% de FBS (HyClone, Berbio, EE.UU.), 50 U/ml de penicilina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania) y 50 U/ml de gentamicina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania). Los cultivos se realizaron en placas de 24 pocillos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ saturado con vapor de agua. Los cultivos se realizaron por duplicado, en placa con una estructura tridimensional porosa biocompatible denominada, comercialmente, *Cytomatrix* (Cytomatrix, Woburn, MA, EE.UU.) y en placa sin dicha estructura. La combinación de citocinas humanas recombinantes purificadas que se emplearon para los cultivos de expansión fueron 25 ng/ml de *Stem Cell Factor* (SCF) o c-kit ligando (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), 25 ng/ml de FLT-3 Ligando (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), 10 ng/ml de Trombopoyetina (TPO) (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania), y 10 ng/ml de IL-3 e IL-6 (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania) respectivamente.

Las células CD34+ se estimularon, en placa con o sin *Cytomatrix*, con cuatro combinaciones diferentes de estas citocinas, en las concentraciones ya mencionadas, con el fin de determinar cual de ellas resultaba más favorable (**Tabla 7**)

Tabla 7. Condiciones de cultivo de las células humanas CD34+, con diferentes combinaciones de citocinas.

Superficie	Placa de cultivo	
	Cytomatrix	
Citocinas	Combinación A	SCF + FLT-3L + TPO
	Combinación B	SCF + FLT-3L + TPO + IL-3
	Combinación C	SCF + FLT-3L + TPO + IL-6
	Combinación D	SCF + FLT-3L + TPO + IL-3 + IL-6

Los cultivos se mantuvieron durante 21 días durante los cuales, dos veces en semana, se añadieron las combinaciones de citocinas, y, una vez en semana, el cultivo se dividió, y se añadió medio fresco y citocinas, con el fin de mantener la densidad celular del cultivo y facilitar su crecimiento. La viabilidad celular se mantuvo en torno al 90%, medida por exclusión con azul tripán.

Tras 7 y 14 días de incubación, se analizaron por microscopia óptica los resultados de proliferación celular.

Para conocer la pérdida de expresión del antígeno CD34 ligada al proceso de proliferación, se identificaron las células, que expresaban el antígeno CD34+ frente a aquellas células que no lo expresaban, por citometría de flujo, al cabo de 14 días de incubación.

Tras la expansión *ex vivo*, se recogieron las células de cada cordón, y se realizó una nueva selección positiva de las células CD34+ procedentes de los cultivos, por MACS, al cabo de 21 días de cultivo. Una vez recogidas las células CD34+, tras esta segunda selección, se congelaron a -70°C hasta su utilización, y en condiciones adecuadas para su recuperación a viabilidad (FBS+DMSO 10%).

4.3.4.2. Depleción de la subpoblación celular CD3+ en las muestras de células CD34+ expandidas *ex vivo*

Las células de cordón umbilical hCD34+, previamente expandidas *ex vivo*, se deplecionaron de la subpoblación de células que expresaban CD3+, mediante separación inmunomagnética (MACS) con un anticuerpo anti-CD3, en un proceso de selección directa empleando CD3 Microbeads (Miltenyi Biotec; Auburn, CA, EE.UU.), en columnas

MiniMACS MS+ (MS Sepation Column, Miltenyi Biotec) (ver anexo: Protocolo de separación inmunomagnética de las células CD3+).

A continuación se determinó, por citometría de flujo, el porcentaje de células que expresaban CD34+ y de células CD3+, que había en cada una de las fracciones obtenidas resultado de la selección de las muestras.

4.3.4.3. Cultivo y crecimiento de las células hCD34+CD3- en el líquido extracelómico del babuino

Las células hCD34+CD3- se cultivaron en dos medios diferentes para evaluar la viabilidad de esta subpoblación celular: **(A)** medio de cultivo RPMI 1640 (Gibo, Invitrogen Corporation) suplementado con 10% de FBS, 50 U/ml de penicilina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania) y 50 U/ml de gentamicina (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania), y los factores de crecimiento empleados para los experimentos de expansión *ex vivo* (25 ng/ml de SCF, 25 ng/ml de FLT-3 Ligando, 10 ng/ml de TPO y 10 ng/ml de IL-6); **(B)** líquido extracelómico del babuino, extraído de un animal gestante de 38 días de desarrollo mediante celocentesis (ver descripción de la técnica en el apartado 4.4.2 de esta sección).

Todos los cultivos se iniciaron con la misma concentración de hCD34+ CD3- de 5×10^5 células en un volumen final de 0,5 ml por pocillo. Los cultivos se realizaron en placas de 24 pocillos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ saturado con vapor de agua.

Se prepararon 5 puntos de cultivo en los que la relación entre los medios **A** y **B** fue la siguiente:

- 1) 1:0 (0,5 ml de A)
- 2) 0:1 (0,5 ml de B)
- 3) 1:1 (0,25 ml de A : 0,25 ml de B)
- 4) 1:2 (0,17 ml de A : 0,33 ml de B)
- 5) 1:8 (0,055 ml de A : 0,445 ml de B)

Los cultivos se mantuvieron durante 20 horas y posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular por microscopia óptica, medida por exclusión con azul tripán, estableciendo así el porcentaje de células vivas, en cada una de las condiciones, a los 30, 60, 90, 240 minutos, y a las 20 horas. Finalmente, al cabo de las 20 horas se determinó, por citometría de

flujo, tomando 5×10^5 células de cada uno de los pocillos, el fenotipo celular de las células supervivientes, según el porcentaje de células CD34+ y de células CD3+.

4.3.5. Cuantificación de las subpoblaciones celulares por citometría de flujo

Se tomaron aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células mononucleares aisladas de la sangre de los cordones umbilicales, y se incubaron con las combinaciones de anticuerpos monoclonales que permiten identificar las principales poblaciones celulares del sistema inmune, y que se estudian, de forma habitual, para determinar el estado inmunológico de un individuo. Además, con el interés de conocer el porcentaje que, sobre el total de la población celular, suponen las células progenitoras, se incluyeron en el panel de citometría los anticuerpos monoclonales que permiten identificar dicha subpoblación (**Tabla 8**).

Los anticuerpos monoclonales empleados en la citometría de flujo, reconocen específicamente los antígenos que caracterizan a cada subpoblación celular, que se expresan en su superficie, y están marcados con un fluorocromo determinado. Este fluorocromo emite una fluorescencia que es identificada por el citómetro, en un canal u otro de detección, en función de su longitud de onda, lo que se traduce en un color: rojo, cuando el anticuerpo va marcado con PerECD o Proteína Clorofila Peridinina; verde, cuando el fluorocromo conjugado es FITC o isotiocianato de fluoresceína; y naranja, cuando es PE o Ficoeritrina. De tal forma, que se pueden aislar las subpoblaciones celulares según los monoclonales que se hayan fijado a su membrana. La **tabla 8** muestra el panel de anticuerpos monoclonales, con el fluorocromo conjugado correspondiente, y las subpoblaciones celulares que identifican la combinación de tres marcadores específicos.

En todos los casos se utilizó un control de fluorescencia inespecífica, utilizando una inmunoglobulina del mismo isotipo que el de los anticuerpos monoclonales específicos, y que no presentó reactividad con células sanguíneas humanas (control isotípico).

Tabla 8. Panel de citometría empleado para la identificación de las subpoblaciones celulares.

	FITC	PE	PerECD	Subpoblaciones
	Anti-IgG1	Anti-IgG1	Anti-IgG1	Control Isotópico
Células T, B, NK (n° absoluto)				
	anti-CD8	anti-CD4	anti-CD3	CD4/CD8
	anti-CD45	antiCD56+CD16	anti-CD3	NK
	anti-CD45	anti-CD20	anti-CD19	B
Subpoblaciones Linfocitarias T CD3+				
	anti-CD2	Anti-CD11a	anti-CD3	Inmaduras
Subpoblaciones Linfocitarias T CD4+				
	anti-HLA-DR	Anti-CD45RO	anti-CD4	Memoria-activadas
	anti-CD45RA	Anti-CD27	anti-CD4	Virgen/efectoras
	anti-CD38*	Anti-HLA-DR	anti-CD4	Activadas
Subpoblaciones Linfocitarias T CD8+				
	anti-HLA-DR	Anti-CD45RO	anti-CD8	Memoria-activadas
	anti-CD45RA	Anti-CD27	anti-CD8	Virgen/Efectoras
	anti-CD38*	Anti-HLA-DR	anti-CD8	Activadas
Subpoblaciones Linfocitarias B				
	anti-CD10	anti-CD5	anti-CD19	Inmaduras
	Anti-CD38	Anti-HLA-DR	anti-CD19	Maduras
Células dendríticas y Progenitoras (puerta SSC vs FSC linfos + monos)				
	anti-CD34	anti-CD133	anti-CD45	Progenitores hematopoyéticos
	anti-BDCA-2	anti-BDCA-1	anti-CD4	Dendríticas

Después de 30 minutos de incubación con los monoclonales, a 4°C y resguardadas de la luz, las células se lavaron 2 veces a 1.700 rpm, durante 5 minutos, a 4°C, con RPMI 1640 suplementado con un 2% de FBS y ácido sódico (0,05%), para eliminar el exceso de anticuerpo marcado con fluorocromo. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACS Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter), utilizando el programa de adquisición System II

(Beckman Coulter), dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células. En todos los casos se analizaron un mínimo de 5.000 células.

Las condiciones óptimas de los distintos parámetros (sensibilidad y amplificación de los detectores FSC (granularidad), SSC (tamaño), FL1, FL2, compensación entre FL1 y FL2) para la adquisición, se determinaron utilizando el reactivo Calibrite (Becton-Dickinson) y el programa AutoComp (Becton-Dickinson) de forma periódica.

4.3.6. Determinación del *xenoquimerismo*

4.3.6.1. Test de aglutinación

La confirmación del grupo sanguíneo de los babuinos incluidos en el estudio se realizó mediante test de aglutinación con sangre total. Para ello se obtuvieron muestras de sangre periférica de los animales, por punción venosa, en tubos de vidrio con anticoagulante EDTA.

La técnica de aglutinación se basa en la presencia, en la membrana de los eritrocitos, de unos marcadores o antígenos de superficie A y B, que permiten identificar el grupo sanguíneo del individuo. El tipo de sangre O, designa la ausencia de los marcadores A y B. Existe, además, otro antígeno en la superficie de los glóbulos rojos denominado antígeno D, que define el factor Rh. La presencia o ausencia de este antígeno es lo que identifica a la sangre como Rh+ o Rh- (163).

El proceso de determinación ABO se realizó en dos pasos: primero se tomó 1 ml de sangre de cada animal y se lavó con PBS, centrifugando cuatro veces a 1.700 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente. A continuación, tras el último lavado, la sangre se diluyó en PBS, se tomó una gota y se mezcló con suero anti-A (suero que contiene anticuerpos contra sangre tipo A) (Anti-A; Gamma Biological Inc. Houston, Texas, EE.UU.), después se tomó una segunda gota y se mezcló con suero anti-B (suero que contiene anticuerpos contra sangre tipo B) (Anti-B; Gamma Biological Inc. Houston, Texas, EE.UU.). La determinación del tipo de sangre se basa en el hecho de que la sangre se aglutine o no, ante la presencia de estos sueros. Las células sanguíneas se pueden unir o aglutinar sólo cuando el anticuerpo anti-A se une al antígeno anti-A (grupo sanguíneo A) o el anticuerpo anti-B se une al antígeno anti-B (grupo sanguíneo B). Cuando las células sanguíneas presentan ambos antígenos A y B en su superficie, estas aglutinarán con ambos sueros, indicando un grupo sanguíneo AB; o, por el contrario, pueden no presentar ninguno, y no producir aglutinación en contacto con los sueros, caso este, en el que nos encontramos ante un grupo sanguíneo O.

La determinación del factor Rh es similar a la determinación ABO. La sangre diluida en PBS tras los sucesivos lavados, se mezcla con el suero que contiene anticuerpos anti-Rh (Anti-D, Gamma Biological Inc. Houston, Texas, EE.UU.) y se observa si se aglutina. Si esto ocurre, la sangre es Rh+; si no hay aglutinación, entonces la sangre es de tipo Rh-.

4.3.6.2. Extracción del DNA

El DNA de las células mononucleares de la sangre, se extrajo utilizando un ensayo comercial (PUREGENE®DNA Purification Kit; Gemtra Systems, Mineapolis, Minesota, EE.UU.) mediante lisis y precipitación de proteínas, posteriormente se precipitó el DNA con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Se resuspendió en 50 µl de solución de hidratación y se guardó a -20°C hasta su utilización.

El DNA de sangre total, se extrajo utilizando el mismo ensayo comercial que en el caso de células (PUREGENE®DNA Purification Kit; Gemtra Systems, Mineapolis, Minesota, EE.UU.), incluyendo al principio del proceso un paso previo de lisis de los eritrocitos (Ver anexo: Protocolos de extracción del DNA)

4.3.6.3. Estudios de caritipo

Por medio de esta prueba se determina el número de cromosomas presentes en las células, o alteraciones cromosómicas estructurales.

El análisis se puede realizar a partir de una muestra de sangre, de médula ósea, de líquido amniótico, de tejido placentario u otros tejidos. La muestra se deja crecer en un cultivo de tejido en el laboratorio, para luego seleccionar las células, teñir los cromosomas y visualizarlos bajo el microscopio. Las células se fotografían para obtener un cariotipo que muestre el número y la disposición de los cromosomas, en un ideograma en función de las diferentes característica (tamaño, tinción, apareamiento, etc) para poder diagnosticar cualquier anomalía presente.

4.3.6.4. Técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia o FISH, utiliza sondas de DNA marcadas con fluorescencia para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas, que, generalmente, están más allá del poder de resolución de la citogenética de rutina o como en esta Memoria, para determinar la presencia de células humanas en los babuinos recién nacidos, a los que se les inyectaron células hCD34+ durante el primer trimestre del desarrollo

embrionario. Para ello se utilizaron sondas para los cromosomas X e Y específicas del DNA humano, y que no hibridan, con el DNA de babuino ((163)).

Primero, la muestra de DNA (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) se desnaturaliza, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del DNA. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con fluorescencia, que se hibridará al DNA de la muestra en el sitio diana, en el proceso denominado “*templado*”, donde se vuelve a formar una doble hélice. La señal de la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia y la muestra de DNA se clasifica según la presencia o ausencia de la señal. La FISH puede utilizarse sobre células en metafase, para detectar microdeleciones específicas más allá de la resolución de la citogenética de rutina, además de para identificar material extra de origen (164).

4.3.6.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR. PCR Anidada o *Nested PCR*

La PCR se empleó para determinación del *xenoquimerismo* a través del factor Rh del grupo sanguíneo, empleando como oligonucleótidos o iniciadores de la reacción, fragmentos de DNA que contienen la secuencia que codifica para el antígeno D o factor Rh en humanos (localizada en el exón 7 del cromosoma 1p34). Se disponía de dos juegos de oligonucleótidos o iniciadores para el gen del Rh (D) humano descritos por Van den Veyver et al (165):

Oligonucleótidos inespecíficos o degenerados: RhDEFw (5'-CCACAGG(G/T)GTGTTGTAA-CCGAGT-3') y RhDER (5'-AGTGACCCACATGCCATTGC-3'), capaces de reconocer la secuencia nucleotídica del Rh (Rh+ y Rh-) de sangre humana, pero, en ningún caso, el Rh de sangre de babuino; y que originan un fragmento de unos 113 pb.

Oligonucleótidos específicos: RhDFw (5'-CCACAGCTCCATCATGGGCTACAA-3') y RhDR (5'-TTGCCGGCTCCGACGGTATC-3'), que sólo reconocen la secuencia del factor Rh+ de sangre humana, originando un fragmento de 99 pb.

La mezcla de reacción para la PCR contenía 2 µl de DNA molde, 25 µl de 2x ReadMix SIGMA (contiene Taq DNA polimerasa + la mezcla de los dNTPs + MgCl₂ + Tris-HCl + KCl) (SIGMA, Sigma-Aldrich, Alemania), y 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos seleccionados: específicos (RhDFw y RhDR) e inespecíficos o degenerados (RhDEFw y RhDER), todo ello en un volumen final de 50 µl, que se completa con H₂O.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin-Elmer Cetus 9600) en las condiciones determinadas en función de los oligonucleótidos o iniciadores utilizados:

- Oligonucleótidos inespecíficos: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 20 ciclos de hibridación a 94°C durante 45 segundos, a 54°C 1 durante minuto y a 72°C durante 1 minuto; y un ciclo extensión a 72°C durante 5 minutos.

- Oligonucleótidos específicos: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de hibridación a 94°C durante 43 segundos, a 62°C durante 1 minuto y a 72°C durante 1 minuto; y un ciclo extensión a 72°C durante 5 minutos.

Todos los procedimientos de preparación de las muestras y amplificación de los productos incluyeron las medidas convencionales recomendadas para evitar la contaminación de las muestras y de los reactivos con productos amplificados por PCR o controles positivos.

Se realizó una primera PCR utilizando solo los oligonucleótidos inespecíficos o degenerados, y los controles correspondientes (Agua, sangre Rh+ humano, Rh- humano). A continuación se realizó una segunda PCR, en las mismas condiciones de mezcla de reacción que la primera y con los mismos controles, pero con los oligonucleótidos específicos.

Por último, se realizó una PCR más específica, Nested PCR o PCR anidada, combinando los dos juegos de oligonucleótidos, primero los oligonucleótidos inespecíficos, y a continuación, empleando como DNA molde, el producto amplificado de la primera reacción, se realizó otra PCR con el juego de oligonucleótidos específicos. Los controles utilizados fueron los mismos que en ocasiones anteriores.

Los productos de las distintas PCRs se sometieron a electroforesis en TAE 1x en gel de agarosa al 2,5% (FMC Bioproducts, Rockland, EE.UU.) teñido con bromuro de etidio 1 µg/ml (Promega), y los productos de la PCR se visualizaron en un transiluminador UV de onda corta (Iberlabo). Como marcador de peso molecular se utilizó 100 pb DNA Ladder (Gibco BRL).

4.3.6.6. Determinación de secuencias *Short Tandem Repeat* humanas por PCR Múltiple

La determinación de las *short tandem repeat* humanas por PCR múltiple se realizó en DNA genómico, extraído según el método anteriormente descrito (ver anexos: protocolo de extracción del DNA), utilizando el AmpFLSTR SGM Plus kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), que contiene 10 STR *loci* y el marcador de género *Amelogenin* (gen homólogo X-Y), que amplifican en un único tubo para facilitar su uso e incrementar el

rendimiento de la reacción. Los iniciadores están marcados en tres colores diferentes: azul 5-*FAM*, verde *JOE* y amarillo *NED*. El rango de tamaño de los productos amplificados fue siempre inferior a 360 pares de bases, para asegurar una correcta amplificación de todos los *loci*. A continuación, estos productos fueron sometidos a una electroforesis capilar en un secuenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) según las condiciones recomendadas por Thiede et al. 2001. La cuantificación del quimerismo se realizó usando el software Genotyper 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y se utilizaron las áreas de los picos obtenidos en el electroferograma para realizar los cálculos correspondientes (166).

La sensibilidad de la técnica estándar es de un 1%, es decir, es capaz de detectar células del donante cuando estas constituyen más de un 1% de la celularidad hematopoyética total. Con el fin de mejorar esta sensibilidad, se realizó una aproximación consistente en aumentar el tiempo de inyección de la muestra en el secuenciador (de 10 a 30 y 50 segundos), con lo que se consigue mejorar la sensibilidad en un orden de magnitud, llegando hasta un 0,1% (Nava et al 2004, datos pendientes de publicar).

4.3.7. Creación de un catálogo de moléculas medidas en el líquido extracelómico humano. Revisión bibliográfica

Se realizó un catálogo, en tres tablas y dos figuras, dependiendo del gradiente existente entre el suero materno y el líquido extracelómico, mediante una revisión de la bibliografía, desde 1.991 hasta octubre 2.003, en PubMed y Medline, de todos aquellos trabajos que hacían referencia a los valores de múltiples moléculas, medidas de forma pareada en el suero materno y el líquido extracelómico de gestaciones humanas durante el primer trimestre del embarazo.

4.4. Técnica de trabajo con los animales de experimentación.

4.4.1. Estudios en animales

Los animales empleados para los estudios incluidos en esta Memoria son babuinos



Figura 22. Animales babuinos en condiciones de semilibertad.



Figura 23. Parte techada de los corrales.

(*Papio Annubis*), una especie primate, que vive en un estado de semilibertad, vigilada y controlada por una serie de personas especialmente capacitadas para su cuidado, en una reserva natural dependiente de la Universidad de Oklahoma, en Reno, en el estado de Oklahoma (The University of Oklahoma – Fort Reno Science Park. 2000 Ben Clark Road Oklahoma, EE.UU.) (**Figura 22**). Los animales están repartidos en cuatro corrales, en los que conviven machos y hembras con sus crías, corrales que comprenden un amplio espacio al aire libre, y que comunican con unas jaulas interiores, donde los animales se protegen de las condiciones climatológicas adversas, y se resguardan para pasar las noches (**Figura 23**). Además, los corrales se mantienen en perfectas condiciones de limpieza para evitar problemas de salubridad.

Con intención de seleccionar las hembras gestantes, los responsables de la reserva emplean un método observacional, basado en el seguimiento del ciclo menstrual, similar al humano, en función de los cambios de coloración, turgencia y exudación que experimentan los genitales externos de estos animales, y el comportamiento sexual con los animales de género masculino (**Figura 24**). Durante la

fase post-menstrual, los genitales externos presentan una coloración pálida, el tamaño no resulta llamativo, y el comportamiento de la mona tiene escasa tendencia a la cópula. Por el contrario, durante la fase ovulatoria y el celo, los genitales externos aumentan de tamaño, se tornan rosáceos y, por el edema y el exudado, resultan exuberantes, llamando la atención del macho, al tiempo que la hembra se comporta de forma más receptiva. En ocasiones, inclusive puede verse tras la cópula, el semen del macho asomando por la vagina de la hembra. En los

casos en los que no exista gestación, semanas más tarde puede observarse un sangrado



Figura 24. Características de los genitales externos femeninos durante la fase ovulatoria.

vaginal. Cuando se produce el embarazo, puede observarse una coloración rojiza de los glúteos y genitales externos, y la desaparición del exudado característico del periodo de celo (**Figura 25**).

Cada ciclo menstrual es seguido meticulosamente desde un puesto de mando, en el que se controlan dos corrales al unísono, diariamente. Se



Figura 25. Características de los genitales externos femeninos durante el periodo gestacional.



Figura 26. Condiciones de trasporte de los animales

apuntan cada uno de los cambios, y de esta forma se conocen, con días aproximados, cual es el tiempo de embarazo de cada uno de los animales.

Debido a que los experimentos realizados para esta Memoria requerían el tratamiento con células hCD34+, las monas fueron trasladadas, desde la reserva, en jaulas individuales especiales, y en un camión acondicionado para dicho transporte, a las instalaciones de la Universidad de Oklahoma, en la ciudad de Oklahoma, antes del procedimiento (**Figura 26**).

En el animalario de la Universidad, los animales permanecen el tiempo que se estime necesario, en función del tipo de estudio y el criterio de veterinarios y cuidadores. Las instalaciones en la Universidad están perfectamente equipadas para

desarrollar cualquier procedimiento en los animales, su posterior recuperación y el mantenimiento de los mismos, el tiempo necesario. Una vez allí, los animales se mantienen en unas jaulas especiales, con espacio suficiente para que el animal pueda moverse. En el momento de estudiar al animal, este es conducido a otra jaula, en la que una de las paredes se desplaza

mediante un mecanismo hidráulico, reduciendo el espacio hasta inmovilizarlo para poder sedarlo. Todos los animales fueron sedados con una dosis de Ketamina intramuscular de 10 mg/Kg de peso, suficiente para 40 minutos de estudio. Cuando el animal está sedado, se lleva



Figura 27. Quirófano de experimentación animal

al quirófano experimental (**Figura 27**), donde se realiza, en primer lugar, al rasurado del abdomen (**Figura 28**), y mediante ecografía abdominal, se confirma la presencia del saco gestacional, del embrión y del latido cardíaco (**Figura 29**). Tras considerar que las condiciones son óptimas para el estudio, se extraen 15 ml de sangre periférica por venopunción a nivel braquial o femoral.

Más adelante se va a explicar, de forma explícita, el control y registro ecográfico mediante de sistemas digitalizados, así como el procedimiento de celocentesis en el animal.



Figura 28. Rasurado de la pared abdominal del animal

Una vez finalizado el procedimiento, se extraen 5 ml de sangre periférica del animal, y antes que la mona se despierte, es devuelta a su jaula, donde permanece vigilada hasta que se confirma que su recuperación es completa. Al cabo de 24 horas, se realiza un reconocimiento ecográfico detallado, y se extraen nuevamente 15 ml de sangre periférica. En las siguientes 72 horas, y antes de ser devueltas a la reserva, se realiza un nuevo control ecográfico, con intención de verificar la presencia de latido cardíaco fetal. Una vez en la reserva, los animales continúan su embarazo en las mismas condiciones que el resto de las hembras de la comunidad.

En función de la información recogida, se calcula de modo aproximado el momento del parto, al cabo de los 182 ± 2 días, con intención de realizar cualquier procedimiento invasivo prenatal, un control o el parto por cesárea. El motivo de esta última, es evitar que el animal digiera la placenta, en lo que es un comportamiento habitual de estos animales tras un parto vaginal espontáneo, y de esa manera pueda analizarse dicho tejido. Al igual que la celocentesis, la cesárea se realiza en las instalaciones de la Universidad, que cuenta con quirófanos adecuados para este tipo de intervenciones.

La colonia de babuinos más importante de Estados Unidos está localizada en San Antonio, Texas, en el Southwest National Primate Research Center y la segunda, pertenece a la University of Washington, en Seattle, seguido por la reserva en University of Oklahoma. En Chicago, New York y Wisconsin el número de animales es más reducido y, finalmente, en Florida, existen pocos babuinos, pero estos pertenecen a la raza de los babuinos amarillos. Cada reserva esta gestionada por un Comité de Investigación que somete a consideración cualquier protocolo de investigación en el que se requiera trabajar con babuinos. En el caso del estudio realizado para esta Memoria, tras recibir la aceptación, por parte de la Universidad de Oklahoma, de cada uno de los procedimientos a realizar en las instalaciones de dicha Universidad, se dispuso de un conjunto de aparatos portátiles para ello, entre los que figuraron un ecógrafo, un equipo de grabación digital y un ordenador portátil:

- Equipo ecográfico (**Figura 29**): Sistema ecográfico portátil SonoSite. Diseñado para



Figura 29. Valoración ecográfica de la gestación en el animal mediante el abordaje abdominal.

la adquisición digital de imágenes de alta resolución, a tiempo real, en modo ecográfico bidimensional, color power Doppler, color power Doppler direccional, ecografía en modo M, Doppler pulsado. El sistema cuenta con un programa especial para realizar ampliaciones,

medidas y cálculos, edición de títulos, y transferencia directa de la información por vía

analógica o digital a otros equipos periféricos. La

adquisición de las imágenes se realizó con una sonda ecográfica abdominal de 4-7 MHz de 11 mm.

(SonoSite, Inc), para la mayoría de los casos. En

aquellos en los que se describe el abordaje de forma

transvaginal se utilizó un ecógrafo Aloka SSD 650 con una sonda vaginal de 5 MHz.



Figura 30. Equipo ecográfico y grabadora de video digital portátiles

- Grabadora de video digital 8 Sony, modelo

GV-D800 (**Figura 30**), con entrada y salida de video

analógico y digital, y audio estéreo y digital. Con un

programa integrado para la edición de títulos y detalles de brillo, luz y color de las imágenes.

- Equipo informático portátil: ordenador portátil Dell, modelo Inspiron 8100 con capturadora de video y software integrado para la edición de video digital, MovieStar versión 1.0.

- Aguja: en los casos en que el abordaje se realizó de forma transvaginal se utilizaron agujas de 17-18 g. y en los casos de abordaje abdominal se utilizaron agujas de 20-22 g.

4.4.2. Celocentesis

El procedimiento de la celocentesis, realizado en cada uno de los animales, se explica detalladamente en el protocolo de estudio en animales de experimentación (ver anexo: Protocolos de estudio en animales de experimentación.). A continuación, se realiza una breve descripción de los pasos que fueron seguidos por todo el equipo que colaboró en cada procedimiento.

Tras la preparación del animal, y previo a la celocentesis, se realiza un estudio ecográfico de la gestación con intención de:

Todas las celocentesis fueron realizadas de forma ecoguiada. En el caso de la vía vaginal con agujas de 17-18 g. y por vía abdominal, con agujas de 20-22 g (**Figura 31**).



Figura 31. Celocentesis transabdominal

Tras la celocetesis, así como, a las 24 y 72 horas, se evaluó ecograficamente la gestación de forma exhaustiva, para visualizar el latido y la frecuencia cardíaca embrionaria, la integridad de las membranas amniótica y vitelina, o la aparición de otras posibles complicaciones, tanto embrionarias como maternas. Cada uno de los

pasos fueron seguidos y registrados, tanto por el equipo de la Universidad de Oklahoma, como por el equipo de la Universidad de Texas Tech.

4.4.2.1. Celocentesis: extracción de líquido extracelómico

Siguiendo el protocolo de estudio en animales de experimentación, se extraen de 1-3 ml de líquido extracelómico de cada animal, en 4 de ellos mediante abordaje transvaginal, y en los 5 restantes por vía abdominal. En todos los casos, la extracción de líquido se realizó sin ninguna complicación. Los 0,5 ml iniciales fueron recogidos en una jeringuilla de 1 ml, que se desechó para disminuir el riesgo de contaminación materna en las muestras. A continuación,

aproximadamente, 2 ml de líquido extracelómico se recogieron en una jeringuilla de 3 ml, y se procesaron en el laboratorio de citogenética de la Universidad de Oklahoma. La muestra se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, obteniéndose un sedimento celular, y un sobrenadante, que se separan por simple decantación del líquido.

4.4.2.1.1 Análisis citogenético en las células procedentes del líquido extracelómico extraído en babuinos gestantes alrededor del día 40 postfecundación

Una vez separadas en un volumen final de 0,5 ml, las células procedentes del espacio extracelómico se cultivaron en **(A)** placas de 96 pocillos de fondo en “U” con 1 ml de medio de cultivo *Amniomax* (solución comercial que habitualmente se emplea para el cultivo de los amniocitos) y 1 ml de medio de cultivo para fibroblastos (N:4), y en **(B)** placas de cultivo de 24 mm x 30 mm con 1 ml de medio de cultivo *Amniomax* (N:5). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ saturado con vapor de agua. Al quinto día de cultivo se cambió el medio. Esta operación se repitió cada dos o tres días, y durante todo el tiempo que se mantuvo el cultivo. Las células se cultivaron hasta obtener un número suficiente de células en metafase para realizar los estudios cromosómicos, de acuerdo a los estándares del American College of Medical Genetics (www.acmg.org).

4.4.2.1.2 Determinación de la concentración de hormonas y citocinas

La concentración de las hormonas: 17hidroxi-progesterona, cortisol, estradiol, β -HCG libre, inhibina A, progesterona y prolactina, y las citocinas: IL-3, IL- 6, IL-7 e IL-12, se determinaron por duplicado, siguiendo las instrucciones de los fabricantes, en las muestras de líquido extracelómico y plasma materno, almacenadas a -80°C, de forma pareada, mediante un ensayo ELISA de alta sensibilidad (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.).

La concentración de las hormonas y citocinas anteriormente mencionadas, junto con el factor de crecimiento de células madre hematopoyéticas (SCF), también se determinaron por duplicado en muestras de plasma materno, antes y después de realizar la celocentesis mediante la misma técnica.

4.4.2.2. Celocentesis: transferencia de células madre hematopoyéticas.

Siguiendo el protocolo de estudio en animales de experimentación, se inyectaron células hCD34+, procedentes de cordones umbilicales de recién nacidos, en animales gestantes que se encontraban entre los 36 y 44 días de desarrollo, vía celocentesis en el espacio extracelómico. Las características de las células humanas inyectadas eran variables en grupo sanguíneo, número de células, si habían sido o no expandidas previamente, y si habían

sido o no deplecionadas de la subpoblación celular CD3+. Como se hace referencia en el protocolo de estudio, inmediatamente después, y en las 24 y 72 horas posteriores al procedimiento, se realizó un control exhaustivo de la gestación, para valorar su evolución, y se extrajo sangre materna (ver anexo: Protocolos de estudio en animales de experimentación.)

4.4.3. Estudios ecográficos durante el primer trimestre del desarrollo embrionario.

Se estudiaron en 18 babuinos gestantes, entre los 35 y 47 días postfecundación, los distintos marcadores ecográficos presentes durante el primer trimestre del desarrollo embrionario: longitud cráneo-caudal (LCC); diámetro medio de los tres diámetros registrados para el saco gestacional (SG), saco amniótico (SA) y el saco vitelino (SV), obtenidos mediante cortes ecográficos longitudinales y transversales; porcentaje de espacio

extracelómico, como resultado del cálculo $\frac{SG - SA}{SG} \times 100$; así como la frecuencia cardíaca embrionaria.

Los mismos marcadores se midieron en 86 gestantes humanas entre 42 y 58 días después de la fecundación, período calculado tras haber sustraído 15 días a la fecha de gestación que se correspondía a la LCC del embrión. En estos pacientes todos los procedimientos se realizaron con sonda vaginal de 6,5 MHz, con un ecógrafo ATL modelos 5.000, 3.500 o 3.000, y las imágenes fueron impresas y registradas para cada paciente. Estableciendo como común denominador los estadios de Carnegie del desarrollo embrionario (113), para el humano y el babuino, se generaron, para cada una de las variables estudiadas, sus curvas de evolución a lo largo de la gestación.

4.4.4. Estudios ecográficos durante el primer, segundo y tercer trimestre del período gestacional

Siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior, en el caso de los animales, se midió el LCC, el diámetro biparietal (DBP), circunferencia cefálica (CC), la circunferencia abdominal (CA), y la longitud femoral (LF), en 12 fetos, que se encontraban alrededor de los días postfecundación 45, 90, 135 y 180. Dado que el período gestacional del babuino es de unos 180 días, momento del parto, dichas fechas constituyen el 25%, 50%, 75% y 100% respectivamente, del total del desarrollo gestacional. En el caso de las gestantes humanas (N:22), dichas variables fueron medidas utilizando sondas abdominales de 3 y 4,5 MHz, en los mismos equipos, y en los días 55, 125, 195 y 265 postfecundación,

correspondientes al 25%, 50%, 75% y 100% del total de la gestación, respectivamente. Tanto en humanos como en animales, se calculó la frecuencia cardíaca fetal en modo M. El cálculo del peso fetal estimado, en ambas especies, se obtuvo a partir de la ecuación que define la curva de Hadlock para la estimación del peso fetal, utilizando la media de la CC, DBP, LF y CA expresada en cm (167).

Curva de Hadlock para la estimación del peso fetal:

Log 10 del peso neonatal (gramos)= 1,3596-0,003686 (CA)(LF) + 0,00064 (CC) + 0,00061(DBP)(CA) + 0,0424(CA)+0,184(LF).

4.4.5. Control de los valores hematológicos en babuinos durante la gestación

Se dispusieron de un total de 9 animales babuinos gestantes a 40, 41, 70, 140 y 180 días postfecundación. Tras extraerles sangre, mediante venopunción a nivel braquial o femoral en tubos de vidrio con anticoagulante EDTA, se realizó un hemograma completo, donde se describe la media de cada una de las variables hematológicas de todos los animales, utilizando como control el intervalo de confianza del 95% de la media de cada valor en individuos humanos sanos.

4.4.6. Estudio de las variables perinatales en humanos y babuinos

Se analizaron un total de 5.786 neonatos humanos nacidos a término y sin complicaciones intraparto, pertenecientes a la población de Amarillo (Texas, EE.UU.), durante enero de 2.001 y diciembre de 2.002. Además, se analizan un total de 49 neonatos babuinos nacidos a término en la colonia de la Universidad de Oklahoma (Oklahoma, EE.UU.) entre agosto de 2.001 y agosto de 2003. En ambas poblaciones se analizaron las variables de edad gestacional (humanos: días de gestación, y babuinos: días postfecundación) y peso neonatal (Kg), para generar normogramas de ambas variables en cada una de las especies.

4.4.7. Evolución de la curva de crecimiento ponderal de los recién nacidos babuinos a término durante el primer semestre de vida postnatal

Se utilizaron 49 neonatos babuinos del apartado anterior. La variable de peso neonatal (Kg) se evaluó, mensualmente, durante los primeros seis meses de vida postnatal. Se analizaron ambas curvas de crecimiento en función de sexo del recién nacido.

4.5. Técnicas estadísticas.

4.5.1. Procesamiento de los datos

Se calculó el número total de CD34+ por ml de sangre, para la determinación de correlaciones entre dicha variable y las variables clínicas obstétrico-neonatales.

Dado que todas las gestaciones babuinas fueron registradas en función del periodo post-fecundación, en los casos en los que se requería hacer comparables gestaciones babuinas y humanas, a éstas últimas, se les restaron 15 días a la edad gestacional, calculada habitualmente desde la fecha de la última menstruación o por los parámetros ecográficos que de forma informatizada calculan dicho periodo.

Recogidos los datos en los formularios de estudio, se introducen todas las variables en una base de datos Access, y se procesan los datos, para su estudio estadístico, mediante el programa SPSS versión 9.0.

4.5.2. Distribución de las variables

Inicialmente, se comprobó si los datos a analizar seguían una distribución normal dentro de cada grupo y si las varianzas eran homogéneas, en cuyo caso se aplicó un método paramétrico. En los casos en los que las variables no cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas, o el tamaño muestral era muy pequeño, se utilizaron métodos no paramétricos.

Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas en este estudio se usó el *test de Kolmogorov-Smirnov* para una muestra. Esta prueba compara la función de distribución acumulada observada para una variable, con una distribución teórica normal. La Z de Kolmogorov-Smirnov se calcula a partir de la diferencia mayor (en valor absoluto) entre las funciones de distribución acumulada teórica y observada (168, 169). Para comprobar que las varianzas de los grupos a comparar son homogéneas, se realiza el *test de Levene* cuya hipótesis nula es que las varianzas son iguales.

Métodos paramétricos

❖ Coeficiente de correlación lineal de Pearson

Este coeficiente permite estudiar la fuerza de asociación lineal entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación lineal inexistente) si $r=0$, aumentando a medida que el

valor de r se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente r indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo (168).

❖ T de Student para muestras independientes

Cuando se deseaba comparar las medias de una determinada variable entre dos grupos y dichas variables cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó la *t de Student*. La distribución t de Student es muy parecida a la distribución normal, pero no requiere disponer de un parámetro de dispersión poblacional y tiene en cuenta el tamaño de la muestra (168).

❖ Análisis de la varianza

La comparación de las medias de cada variable, cuando se estudiaban más de dos grupos, se efectuó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las variables deben cumplir los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Este análisis estudia la variabilidad entre los grupos y dentro de los grupos. La *F Snedecor* detectará si las medias de, al menos un grupo, difieren del resto (168). Si existen diferencias significativas entre los distintos grupos se realizan las denominadas comparaciones *post hoc* para determinar entre qué grupos concretos se dan estas diferencias, como la prueba de *Scheffe*, cuando las varianzas son homogéneas, o la prueba de *Tamhane*, cuando no son homogéneas.

Métodos no paramétricos

Las pruebas estadísticas no paramétricas se usaron cuando la muestra fue pequeña o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas).

❖ U de Mann-Whitney

Contrasta si dos muestras de dos subpoblaciones tienen la misma distribución. Las observaciones de ambos grupos se combinan y clasifican con respecto al rango promedio asignado en caso de producirse empates. Si la posición de las poblaciones es idéntica, deberán mezclarse aleatoriamente los rangos en ambas muestras.

❖ Análisis de correlación de Spearman

Variante de coeficiente de correlación de Pearson. Es una medida de asociación que se calcula a partir de la asignación de rangos a los valores ordenados. Dicha asociación será nula si $R=0$, aumentando a medida que el valor de R se aproxima a 1 ó a -1. El signo del

coeficiente R indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo.

5. RESULTADOS

5.1. Estudios en humanos

5.1.1. Características clínicas materno-neonatales de las muestras recogidas de sangre de cordón umbilical

Se seleccionaron 45 recién nacidos sanos, de gestaciones únicas, de los que se recogió la sangre del cordón umbilical, tras obtener el consentimiento informado y firmado de cada una de las madres, tal y como se explica en el apartado 4.1.1 de estudios en humanos y en el apartado 4.3.1 de técnicas de laboratorio, de la sección de sujetos de estudio y métodos. Tanto las madres, como los recién nacidos, fueron dados de alta hospitalaria tras evolucionar de forma favorable y no presentar ningún tipo de complicación post-parto. Se analizaron las variables clínico-analíticas maternas resumidas en la **tabla 9**. En esta tabla, se describen las variables continuas en función de la media, desviación típica (D.T) así como el valor máximo y mínimo. Las variables hematológicas se describen en función de la media y D.T y se detalla para cada parámetro estudiado el intervalo de confianza del 95% de la media de cada valor de la población sana. El resto de variables se expresan en porcentajes.

Se observó que la distribución de las variables edad materna, peso materno, talla materna, y edad gestacional, así como los parámetros analíticos hematológicos, seguían una distribución normal. La media de cada una de las variables hematológicas maternas, se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% de la media de la población sana.

Por otra parte, se analizaron las variables referentes a la vía del parto, que quedan resumidas en la **tabla 10**. En esta tabla los valores se expresan en número y porcentaje, en función del tipo de parto, así como las variantes dentro de cada tipo.

Tabla 9. Análisis estadístico de las variables clínico-hematológicas maternas más relevantes de las 45 madres a cuyos recién nacidos se le extrajo sangre del cordón umbilical.

	%	Media	D.T.	Mínimo	Máximo
Edad materna (años)		24,64	7	17	42
Peso materno (Kg)		80,23	17	50	120
Talla materna (cm)		162,56	8	147	180
Edad gestacional (semanas)		39,1	1,7	37	41
Grupo étnico					
Caucásica	50				
Hispana	47,1				
Afro-Americana	2,9				
Grupo sanguíneo					
O ⁺	24				
O ⁻	4				
A ⁺	28				
A ⁻	4				
B ⁺	6				
B ⁻	2				
AB ⁺	32				
AB ⁻	0				
Parámetros analíticos hematológicos					
	Unidades	Media	D.T.	Valores de referencia (95% I.C.)	
Hemoglobina	g/dl	12,29	1,1	10,5	13,7
Hematocrito	%	35,84	3,2	29,30	40,9
Leucocitos	10 ³ /U1	11,55	2,9	7,10	15,5
Plaquetas	n°células/ml	217.000	50.700	141.000	297.000

Tabla 10. Vía del parto y el tipo de parto de las 45 madres a cuyos recién nacidos se le extrajo sangre del cordón umbilical.

Vía del parto	N	%
Vaginal	21	46,7
Cesárea	24	53,3

Parto vaginal	N	%
Espontáneo	43	95
Inducido	2	5

Parto por cesárea	N	%
Electiva	31	69
Emergencia	14	31

Se analizaron las variables neonatales más relevantes resumidas en las tablas 11,12, 13 y 14. Se describen las variables continuas en función de la media, desviación típica (D.T) así como el valor máximo y mínimo. Las variables hematológicas se describen en función de la media y D.T y se detalla para cada parámetro estudiado el intervalo de confianza del 95% de la media de cada valor de la población sana. El resto de variables se expresan en porcentajes. El análisis demostró que todas las variables cuantitativas seguían una distribución normal (**Tabla 11 y 13**). En relación a los valores del test de Apgar, tanto al 1º como al 5º minutos, así como el pH de la sangre del cordón umbilical, no se observaron complicaciones intraparto. En uno de los recién nacidos, el valor del test de Apgar al 1º minuto fue de 6 (**Tabla 12**). En este caso, el parto fue por cesárea de emergencia, se obtuvo un pH en sangre de cordón de 7,20 y valor en el test de Apgar al 5º minuto fue de 9. En relación a los parámetros hematológicos, la media de cada una de los valores analizados se encontraba dentro del intervalo de confianza del 95% de la media de la población sana (**Tabla 13**). Finalmente, se describen los grupos sanguíneos analizados en la sangre del cordón umbilical (**Tabla 14**).

Tabla 11. Resultados clínicos neonatales intraparto

Variable	Media	D.T	Mínimo	Máximo
Peso neonatal (gramos)	3.320	312	2.540	4.196
pH de la sangre del cordón	7,27	0,05	7,16	7,34

Tabla 12. Resultados clínicos neonatales

Sexo neonatal	N	%
Femenino	28	54,2
Masculino	17	45,8
Valor del test de Apgar al 1º min	N	%
< 7	1	2,9
≥ 7	44	97,1
Valor del test de Apgar al 5º min	N	%
≥ 7	45	100

Tabla 13. Resultados hematológicos en neonatos.

Parámetros analíticos hematológicos	Media	D.T	Valores referencia (95% I.C.)	
Hemoglobina (g/dl)	16,00	2,91	11,20	20,00
Hematocrito (%)	41,55	10,61	26,00	48,90
Leucocitos (10^3 /UI)	20,50	5,99	13,60	24,40
Volumen corpuscular medio (fl)	106,07	5,46	100,20	111,00
Plaquetas (10^3 /UI)	204.000	59.000	111.000	277.000
Eritrocitos (10^6 /UI)	4,58	0,25	4,40	4,76
Porcentaje de eritrocitos nucleados	7,67	4,51	3,00	12,00
Porcentaje de segmentados	59,33	4,62	54,00	62,00
Porcentaje de linfocitos	25,67	13,05	11,00	36,00
Porcentaje de monocitos	4,00	0,09	2,00	4,00

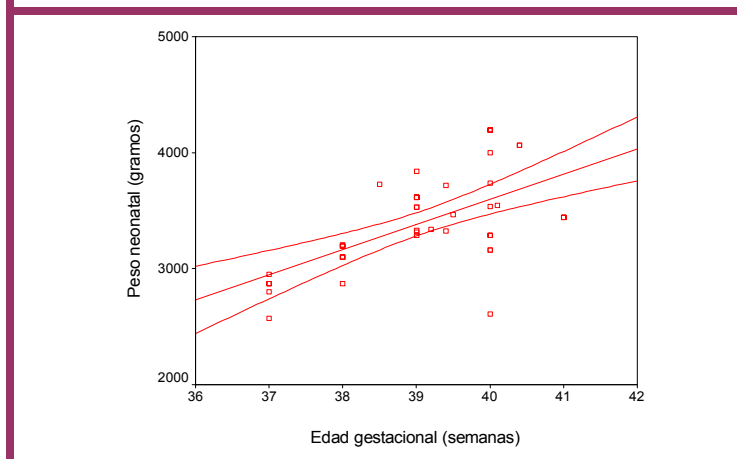
Tabla 14. Grupos sanguíneos de la sangre de cordón umbilical de los recién nacidos.

Grupo sanguíneo neonatal	N	% del grupo sanguíneo neonatal
O ⁺	23	51,11
O ⁻	3	6,67
A ⁺	12	26,67
A ⁻	0	0
B ⁺	5	11,11
B ⁻	0	0
AB ⁺	2	4,44
AB ⁻	0	0

Habitualmente, el peso neonatal en gestaciones sanas a término y sin patología obstétrica-perinatal, se correlaciona de forma directamente proporcional a la edad gestacional. Al igual que en estos casos, el análisis en los recién nacidos a los que se le extrajo sangre del cordón umbilical, demostró que el peso neonatal se correlaciona de forma significativa con la edad gestacional y que dicha relación puede describirse por la fórmula de la recta de regresión: *Peso neonatal (gramos):* $161,236 \times \text{edad gestacional (semanas)} - 2955$; $R^2:53\%$; $p < 0,003$. En la

figura 32 se representa la recta de regresión y los intervalos de confianza del 95% de la media de la recta de regresión.

Figura 32. Correlación entre el peso neonatal y la edad gestacional de los recién nacidos en los que se recogió sangre del cordón umbilical.



Finalmente, se realizó una análisis comparativo de la media de edad gestacional y peso neonatal entre los 45 recién nacidos en los que se recogió sangre del cordón umbilical y los 5.786 recién nacidos a término (37-40 semanas cumplidas de embarazo) de gestaciones únicas y sin complicaciones intraparto atendidos en dos hospitales de Amarillo (Texas, EE.UU.), entre enero de 2.001 y diciembre de 2.002. No se encontraron diferencias entre ambas poblaciones, para dichas variables ($p>0,05$).

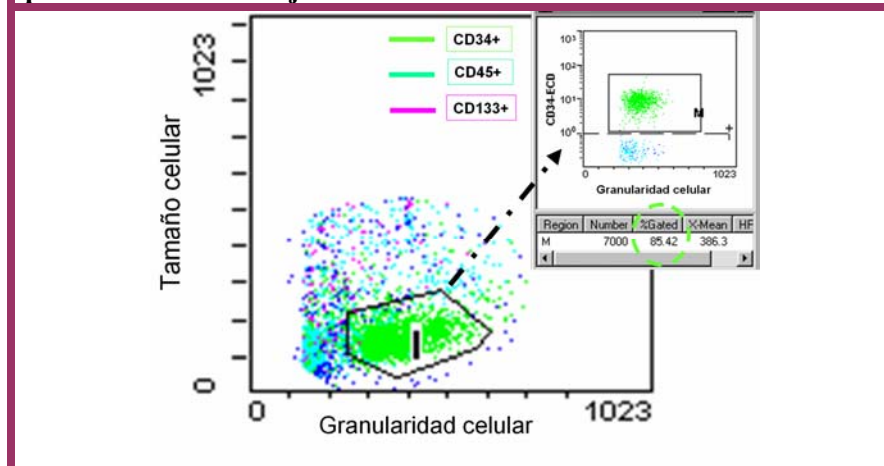
En resumen, basados en los resultados del estudio de las variables maternas-neonatales analizadas, el conjunto de individuos de los que se obtuvo sangre de cordón umbilical eran gestantes a término, sin complicaciones intraparto y con resultados neonatales inmediatos, característicos de una población sana.

5.1.2. Porcentaje de pureza de las células CD34+ aisladas por separación inmunomagnética

Se realizó un análisis del porcentaje de expresión del antígeno CD34 por citometría de flujo, en 10 muestras de células CD34+ previamente aisladas por MACS de la sangre del cordón umbilical. La media \pm D.T. y el rango (min,máx) del porcentaje de pureza fue de 83 % \pm 6 (63,91). En la **figura 33**, se representan los resultados obtenidos en una muestra donde se obtuvo un porcentaje de pureza del 85,42% de células que expresan el antígeno CD34. Tras el

análisis se construye una gráfica en función del tamaño y la granularidad de las células. En esta, se selecciona entonces una ventana (I) en la que por ambas características, se sitúan las células leucocitarias, a partir de la cual se puede identificar el porcentaje de células que expresan o no uno u otro antígeno, CD34 en este estudio.

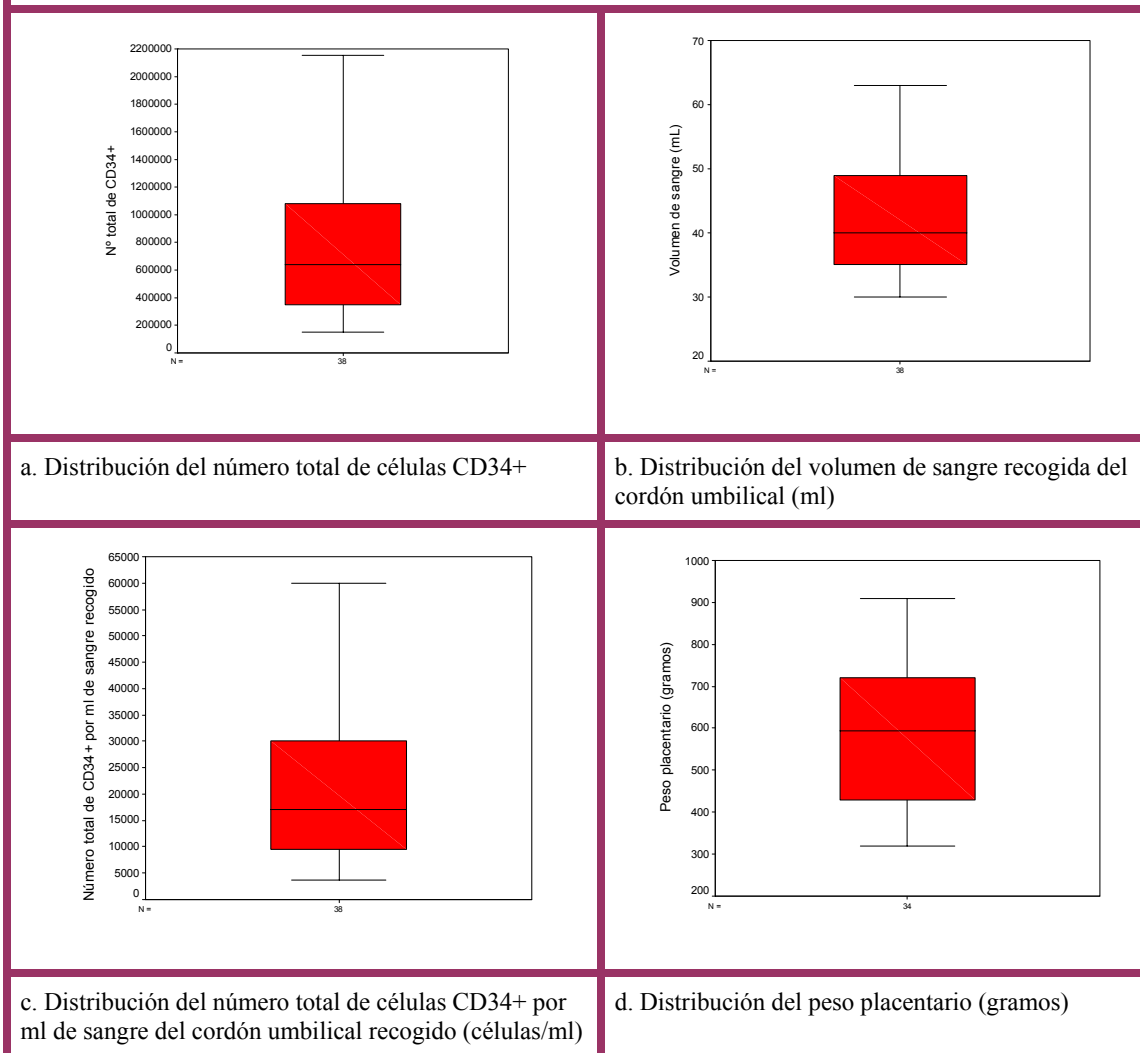
Figura 33. Análisis del porcentaje de pureza de las células CD34+ por citometría de flujo.



5.2. Relación entre el número de células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos y las variables clínicas obstétrico-neonatales

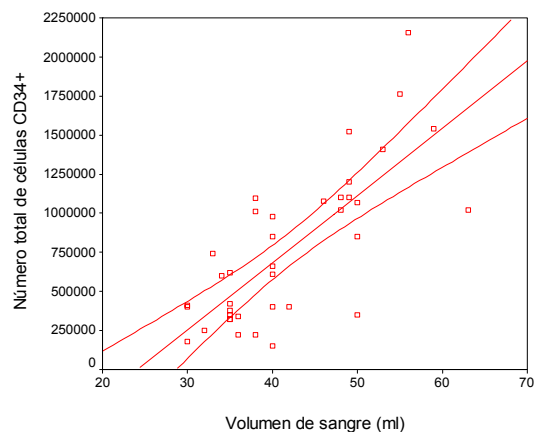
En primer lugar, se analizó la distribución del volumen de sangre del cordón umbilical recogida en el total de 45 recién nacidos sanos. Para el análisis, se descartaron 7 de las muestras debido a que el volumen fue menor de 30 ml. De las 38 muestras restantes, la media \pm D.T. y el rango (min,max) del número total de células CD34+ obtenidas por MACS fue de 766.000 ± 49.000 (150.000; 215.000) células; el volumen de sangre recogido fue $38,4 \pm 6$ (30; 63) ml., el número total de células CD34+ por ml de sangre recogido fue 20.700 ± 1.380 (3.750; 59.800) células/ml y el peso de la placenta fue de $590,71 \pm 139,45$ (350; 1210) gramos (**Figura 34**). Se observó una relación directa entre el número de células CD34+ y el volumen de sangre recogido (**Figura 35**). En la **figura 35** se representa la recta de regresión, los intervalos de confianza del 95% de la media de dicha recta y la fórmula que la describe.

Figura 34. Distribución en diagramas de cajas del número total de células CD34+ procedentes del cordón umbilical (a), del volumen de sangre recogido (b), del número total de células CD34+/ml de sangre recogida (c), y el peso placentario (d).



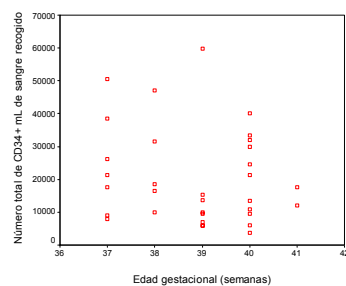
Seguidamente, se analizó si existía relación entre el número total de células CD34+ por ml de sangre recogida, y las variables clínicas materno-neonatales más relevantes. Tras el análisis, se encontró que el número total de células CD34+ por ml de sangre recogida fue independiente de la edad materna, grupo étnico, grupo sanguíneo materno, vía del parto, edad gestacional, peso neonatal, sexo neonatal, grupo sanguíneo neonatal, así como del valor del test de Apgar al 1º y 5º minuto. Por el contrario, se encontró una relación directamente proporcional entre el número total de células CD34+ por ml de sangre recogida y el peso placentario y que puede describirse por la fórmula de la recta de regresión: *Nº total de CD34+ por ml de sangre* = $58,2 \times \text{peso placentario (gramos)} + 12870$; $R: 59\%$, ($p: 0,001$) (Figura 36).

Figura 35. Correlación entre el número total de células CD34+ y el volumen de sangre del cordón umbilical recogido en 38 recién nacidos.

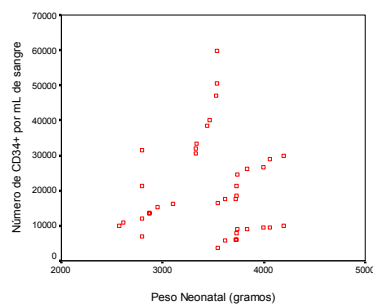


$$N^{\circ} \text{ total de CD34+} = 1,2 \times (\text{ml de sangre}) + 14,680; R^2:57, (p: 0,002)$$

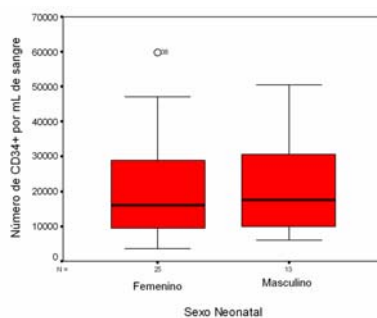
Figura 36. Correlación entre el número total de células CD34+ por ml de sangre recogido del cordón umbilical, y las variables edad gestacional (a), peso neonatal (b), sexo neonatal (c), y peso placentario (d).



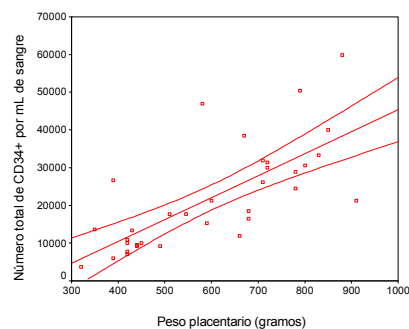
a. p: 0,61



b. p: 0,13



c. p: 0,27



d. p: 0,001

En resumen, los resultados presentados en esta Memoria muestran la existencia de una relación directamente proporcional entre el peso neonatal y la edad gestacional en los 45 recién nacidos de la muestra estudiada, entre el número de células CD34+ totales y el volumen de sangre recogido ($p < 0,01$), así como entre el número de células CD34+ por ml de sangre de cordón recogida y el peso placentario ($p < 0,01$). El número de células CD34+ por ml de sangre de cordón recogida fue independiente del resto de variables obstétrico-neonatales analizadas.

5.2.1. Expansión *ex vivo* de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical.

En los resultados descritos anteriormente, se encontró que la media del número de células CD34+ aisladas de la sangre del cordón umbilical, fue de 766.000 ± 49.000 células. Con el objetivo de incrementar dicho número y de conocer como se expandían *ex vivo* las células CD34+, cinco de las muestras procedentes de los 45 recién nacidos, se cultivaron, durante 21 días, en placa de cultivo y en placa de cultivo con Cytomatrix, añadiendo, en ambos casos, diferentes combinaciones de citocinas, como se explica la **tabla 7** del apartado 4.3.4.1 de sujetos y métodos de estudio.

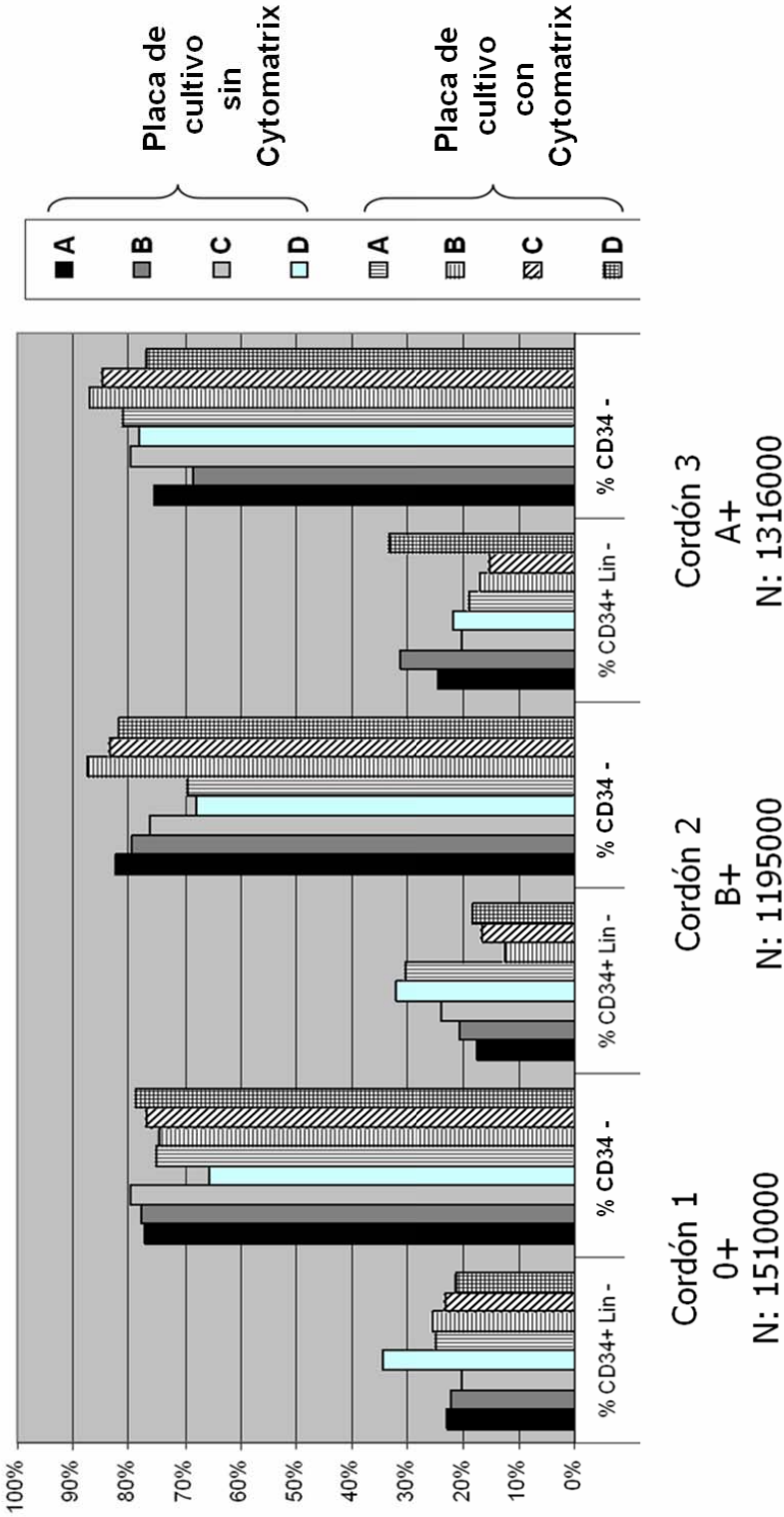
Tras 7 y 14 días de incubación, se contaron las células en cada una de las condiciones de cultivo y se observó que, a dichos tiempos, la media \pm D.T. de incremento de proliferación celular fue de $1,93 \pm 0,23$ y de $9,71 \pm 1,1$ veces; respectivamente. Debido al reducido número de muestras, no se pudo realizar un análisis comparativo entre las distintas condiciones de cultivo, grupo sanguíneo, y tiempo de cultivo, aunque se observó que en todas las muestras la media de incremento era homogénea (**Tabla 16**).

Al cabo de los 14 días de cultivo, se analizó el porcentaje de células que expresaban o no el antígeno CD34, en cada una de las condiciones de cultivo, por citometría de flujo. Se observó que la media \pm D.T. del porcentaje de pérdida de la expresión del antígeno CD34, fue de $78,3 \pm 6\%$. Debido al reducido número de muestras con que se contaba, no se pudieron demostrar diferencias entre las condiciones de cultivo, aunque en este caso se observó que, tanto en placa de cultivo sin Cytomatrix, como en placa de cultivo con Cytomatrix, la combinación de las citocinas (D) SCF + FLT-3L + TPO + IL-3 + IL-6 fue la que presentó los porcentajes más bajos de pérdida de expresión del antígeno CD34 (**Figura 37**).

Tabla 16. Capacidad de proliferación de las células CD34+ teniendo en cuenta el tipo de placa de cultivo, la combinación de citocinas empleada, el grupo sanguíneo y el tiempo de cultivo celular.

Combinación de citocinas	Grupo Sanguíneo	Placa sin cytomatrix				Placa con cytomatrix				Nº de células	Incremento del número de células por células por cordón
		A	B	C	D	A	B	C	D		
Cordón 1	(0+)	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000		
1 semana		450000	480000	410000	460000	410000	440000	400000	450000	3500000	2,5
2 semanas		1050000	1550000	1582000	1850000	1600000	1180000	1680000	1588000	12080000	11,1
Cordón 2	(B+)	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000		
1 semana		330000	370000	300000	360000	310000	340000	280000	330000	2620000	1,6
2 semanas		1200000	1150000	1460000	1120000	1180000	1020000	1430000	1000000	9560000	8,6
Cordón 3	(A+)	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000	125000		
1 semana		360000	380000	310000	340000	330000	350000	300000	300000	2670000	1,7
2 semanas		1420000	1658000	1380000	1390000	1460000	1080000	990000	1150000	10528000	9,5
Incremento del número de células según el tipo de cultivo en 1 semana		2 ± 0,5	2,3 ± 0,48	1,7 ± 0,48	2,1 ± 0,51	1,8 ± 0,42	2 ± 0,44	1,6 ± 0,51	1,9 ± 0,63		
Incremento del número de células según el tipo de cultivo en 2 semanas		8,8 ± 1,6	10,6 ± 2,1	10,8 ± 0,8	10,6 ± 3	10,3 ± 1,7	7,7 ± 0,6	9,9 ± 2,8	9 ± 2,4		

Figura 37. Fenotipo celular basado en la expresión del antígeno CD34 en 3 muestras de células CD34+ expandidas ex vivo tras 14 días de cultivo.



Finalmente, tras 21 días de cultivo, se recogieron todas las células de cada una de las muestras, y nuevamente se separaron las células CD34+ por MACS, encontrándose una media \pm D.T. de incremento de $4,6\pm 0,6$ veces con respecto al número de células CD34+ con las que se inició la expansión *ex vivo* (1.000.000 de células) (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados de la expansión *ex vivo* de las células CD34+ tras 21 días de cultivo y posterior selección positiva por MACS.

Muestra	Grupo sanguíneo	Número total de células	Número total de células CD34+ aisladas por MACS	% de las CD34+ en relación al número total de células	Incremento en relación al número inicial de células CD34+
Cordón 1	(0+)	19.820.000	5.620.000	28,36	4,62
Cordón 2	(B+)	11.560.000	4.590.000	42,32	3,89
Cordón 3	(A+)	18.240.000	6.400.000	35,09	5,4
Media \pm D.T		16.540.000 \pm 357.998	5.536.666 \pm 741.275	35,26 \pm 6	4,64 \pm 0,6

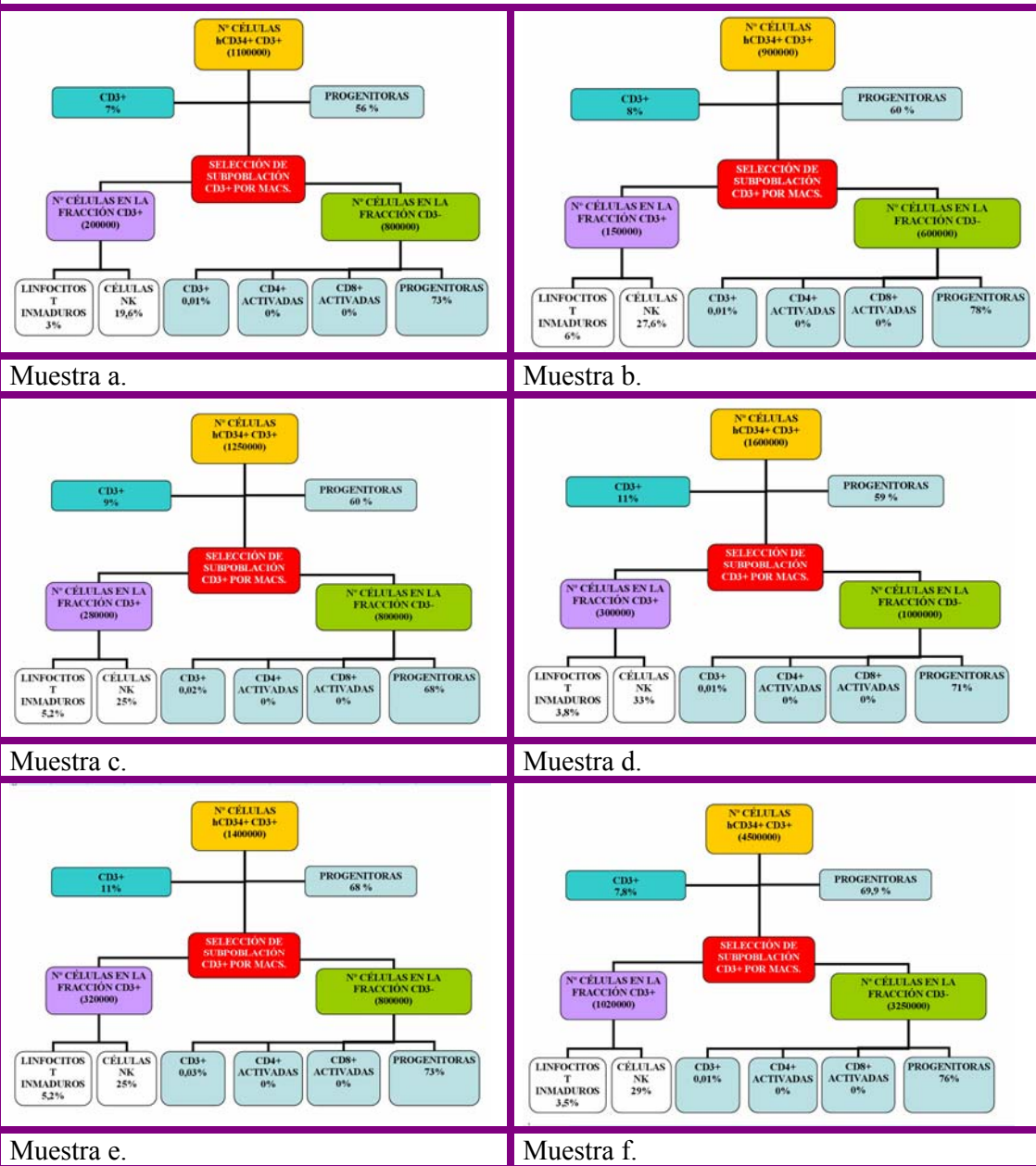
En resumen, tras la expansión *ex vivo* de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos, se observó una tasa de proliferación celular de alrededor de 2 y 10 veces, a los 7 y 14 días de cultivo, respectivamente. Dicha proliferación celular parece estar ligada al hecho de que cerca del 78% de las células pierdan la expresión del antígeno CD34 al cabo de 14 días de cultivo. Tras 21 días de expansión, y nueva selección de células CD34+ por MACS, se obtuvo un incremento cercano a 5 veces el número de células CD34+ con las que se inició el cultivo.

5.2.2. Depleción de la subpoblación de células CD3+ por MACS en las células CD34+, procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos, expandidas *ex vivo*

A partir de las células CD34+ expandidas *ex vivo* y nuevamente seleccionadas por MACS, se realizó una depleción de la subpoblación celular que expresaba el marcador CD3 (marcador de células linfoides) por MACS. Antes de realizar la depleción, se realizó un análisis, por citometría de flujo, de cada una de las muestras para determinar el porcentaje de células progenitoras CD34+ y de las células CD3+. Tras la depleción, en las células seleccionadas de forma positiva (CD3+), se cuantificó el porcentaje de linfocitos T inmaduros (CD3+CD2+CD11a) y de células NK (CD3+CD56+CD16+CD45+); y en las células

seleccionadas de forma negativa (CD3-) se cuantificó el porcentaje de células CD34+, la presencia o no residual de un pequeño porcentaje de células CD3+, que hubieran escapado al proceso de selección, así como el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados (CD4+HLA-DR+CD38+) y linfocitos T CD8+ activados (CD8+HLA-DR+CD38+) (Figura 38).

Figura 38. Porcentajes de las distintas subpoblaciones celulares, obtenidos antes y después de la depleción de la subpoblación celular CD3+, en 6 muestras de células CD34+ procedentes del cordón umbilical de recién nacidos (hCD34+) previamente expandidas ex vivo.



Se realizó un análisis de los resultados obtenidos a lo largo del procedimiento que se resume en la **tabla 17**. Se observó que tras la depleción de las células CD3+ por MACS, existe una pérdida celular

$$\frac{N^{\circ} \text{células } hCD34 \text{ positivas} - (\text{subpoblación } CD3 \text{ positiva} + \text{subpoblación } CD3 \text{ negativa})}{N^{\circ} \text{células } hCD34 \text{ positivas}}$$

cercana al 14% de hCD34+ menos, y que el porcentaje de células seleccionadas de forma positiva para CD3+ por MACS fue el doble que el porcentaje de células CD3+ identificadas por citometría de flujo. Así mismo, en las células seleccionadas de forma positiva, una de cada cuatro células ($26,5\% \pm 4,5\%$) eran células NK ($CD3+CD56+CD16+CD45+$). Como era de esperar, tras la depleción de las células CD3+ por MACS, el porcentaje de dicha subpoblación disminuyó de $9 \pm 1,7\%$, a prácticamente 0%, y no se encontraron linfocitos T activados ($CD4+/CD8+HLA-DR+CD38+$) (**Tabla 17**).

Tabla 17. Depleción de la subpoblación celular CD3+ por MACS de las células hCD34+. Resultados obtenidos antes y después de la depleción. Se describe el porcentaje de las células: CD34+, CD3+, linfocitos T inmaduros y células NK, identificados por citometría de flujo, así como el porcentaje de pérdida celular tras la depleción de células CD3+.

Muestra	Antes de la depleción de células CD3+			Selección positiva (CD3+)					Selección negativa (CD3-)		Tras depleción
	Nº total de células hCD34+	% células CD34+	% células CD3+ por FACS	Nº total de células CD3+ por MACS	% células CD3+ por MACS	% Linfocitos T inmaduros	% Células NK	Nº total de células CD3-	% células CD34+	% de pérdida celular tras depleción	
a	1100000	56	7	200000	18,2	3	19,6	800000	73	9,1	
b	900000	60	8	150000	16,7	6	27,6	600000	78	16,7	
c	1250000	60	9	280000	22,4	5,2	25	800000	68	13,6	
d	1600000	59	11	300000	18,8	3,8	33	1000000	71	18,8	
e	1400000	68	11	320000	22,9	5,2	25	800000	73	20	
f	4500000	69,9	7,8	1020000	22,7	3,5	29	3250000	76	5,1	
Media ± D.T.	1791666 ± 1348486	62,2 ± 5,5	9 ± 1,7	378333 ± 320899	20,3 ± 2,7	4,5 ± 1,2	26,5 ± 4,5	1208333 ± 1008174	73,2 ± 3,5	13,9 ± 5,8	

5.3. Estudios de supervivencia de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos sanos, deplecionadas de la subpoblación CD3+, en líquido extracelómico del babuino

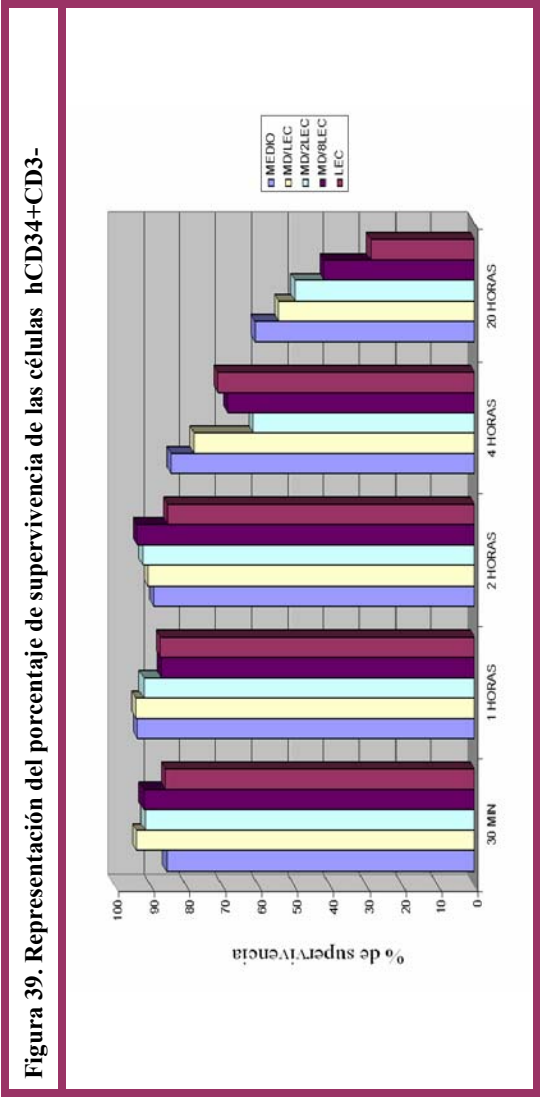
En la mayoría de los animales de experimentación, se inyectaron células hCD34+ expandidas *ex vivo* y deplecionadas de la subpoblación celular CD3+, a las que se define como hCD34+CD3-. Los resultados obtenidos en los experimentos de expansión *ex vivo*, demostraron que las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical, proliferan en condiciones de cultivo adecuadas en medio y citocinas. Basados en estos resultados, se realizó un análisis comparativo de la supervivencia de las células hCD34+CD3- en el líquido extracelómico del babuino, extraído por celocentesis ecoguiada a los 38 días de gestación, así como en dicho líquido a diferentes proporciones con medio de cultivo y citocinas. Las células hCD34+CD3- utilizadas fueron las resultantes del procedimiento que se explica en la muestra f del experimento anterior (**Figura 38**).

La **tabla 18** y la **figura 39** resumen los resultados de la supervivencia de las células hCD34+CD3- en las distintas condiciones de cultivo, a diferentes tiempos de evaluación. Se observó que el porcentaje de supervivencia celular se relaciona de forma inversamente proporcional al incremento en la proporción de líquido extracelómico presente en el cultivo y al tiempo de cultivo. En la **tabla 18**, se describe además, el fenotipo de las células supervivientes tras 20 horas de incubación, de acuerdo a la expresión del antígeno CD34+ o CD3+. Además, se observó que el porcentaje de células CD34+ se relaciona de forma inversamente proporcional al incremento en la proporción de líquido extracelómico presente en el cultivo.

Tabla 18. Porcentaje de supervivencia y fenotipo celular de las células hCD34+CD3-

N° total de células iniciales	Proporción Medio:LEC	Porcentaje de supervivencia celular					Fenotipo de las células supervivientes tras 20 horas	
		30 Min	1 Hora	2 Horas	4 Horas	20 horas	% células CD34+	% células CD3 ⁺
500.000	1:0	85,71	93,75	89,19	84,38	61,11	63,5	1
500.000	0:1	86,11	87,50	85,29	71,43	28,95	28,3	3
500.000	1:1	94,12	94,29	90,91	78,05	54,55	39,9	1
500.000	1:2	91,67	92,11	92,31	61,54	50,00	ND	ND
500.000	1:8	92,11	87,18	93,75	68,57	41,86	12,4	1

LEC: Líquido extracelómico; ND: no determinado



5.4. Análisis de la composición bioquímica del líquido extracelómico

Tras una exhaustiva revisión de la bibliografía de los artículos publicados entre enero de 1.991 y diciembre de 2.003, se realizó un catálogo de moléculas medidas, de forma pareada, en sangre materna y líquido extracelómico, en gestaciones humanas, durante el primer trimestre de embarazo, previa interrupción voluntaria de la gestación. Dicho catálogo se representa en las **tablas 19, 20 y 21** y las **figuras 40 y 41**. Las tablas describen, para cada una de las moléculas, la media tanto en sangre materna, como en líquido extracelómico, los rangos de edad gestacional y el tamaño muestral, así como el artículo de referencia. Cuando dos o más trabajos, describían las mismas moléculas en edades gestacionales similares, se calculó la media de las medidas y se sumó el número de casos. El cálculo del gradiente de concentración de cada una de las moléculas entre el compartimento materno y el líquido extracelómico se realizó empleando la fórmula

$$\left(\frac{\text{Compartimento, de, mayor, concentración} - \text{Compartimento, de, menor, concentración}}{\text{Compartimento, de, menor, concentración}} \right) \times 100\%.$$

Para describir el límite de equilibrio entre ambos compartimentos, se consideró el gradiente que presenta la inulina (aproximadamente 30%), por ser una sustancia inerte que no se metaboliza, ni se le conoce un transporte específico en el organismo, y que además, a nivel placentario, pasa al espacio embrionario a través del espacio extracelular dependiendo de su tamaño molecular (170).

La **tabla 19** y la **figura 40** describen las moléculas que se encuentran en equilibrio de concentración (+/-30%) entre el líquido extracelómico y la sangre materna.

La **tabla 20** describe aquellas moléculas que presentan un gradiente mayor del 30% entre el líquido extracelómico y la sangre materna. Dichas moléculas se producen de forma mayoritaria dentro del saco gestacional, o se transportan de forma activa a través de la membrana corio-decidual, desde la madre.

La **tabla 21** describe aquellas moléculas que presentan un gradiente mayor del 30% entre la sangre materna y el líquido extracelómico. Dichas moléculas en su mayoría son hormonas y proteínas producidas en el compartimento materno y debido a su elevado peso molecular pasan de forma limitada la membrana corio-decidual.

Las moléculas que no se encuentran en equilibrio entre ambos compartimentos, se agruparon en función de la naturaleza bioquímica: hormonas, citocinas, proteínas y

aminoácidos. La concentración de dichas moléculas depende del lugar en donde se producen, del peso molecular, así como de las necesidades del embrión en desarrollo, así por ejemplo, la mayoría de los aminoácidos esenciales, pasan de la madre al embrión en desarrollo (**Figura 41**).

Tabla 19. Moléculas descritas en equilibrio (+/-30%) entre el líquido extracelómico y la sangre materna, medidas en gestaciones humanas durante el primer trimestre de gestación.

Moléculas	Unidades	Media LEC	Media SM	Edad gestacional (semanas)	Nº	Referencia
Inulina	(mg/ml)	4,8	6,9	8-11	9	(171)
Glucosa	(mmol/l)	2,7	3,4	7-14	55	(172)
Fentanilo	(ng/ml)	1,1	1,2	7-14	48	(173, 174)
Serina	(mmol/l)	116	126	7-11	17	(175)
Potasio	(mmol/l)	3,8	4,1	5-13	30	(154)
Sodio	(mmol/l)	130,9	135,9	5-13	30	(154)
Triptofano	(µmol/l)	29	30	7-11	17	(176)
Eritropoietina	(mIU/ml)	15,45	15,4	7-12	20	(177)
Cloro	(mmol/l)	107,5	105	7-12	34	(172, 178)
Creatinina	(µmol/l)	52,4	50,3	5-13	34	(154, 178, 179)
MCP-1	(pg/ml)	151,5	142,6	8-11	27	(180)
Calcio	(mmol/l)	2,52	2,3	7-12	40	(172, 178, 181)
Activina A	(ng/ml)	0,535	0,42	8-11	50	(182, 183)
Urea	(mmol/l)	8,3	7,2	7,2	5-13	(154)

MCP-1: *Macrophage chemoattractant protein 1*

Figura 40. Moléculas descritas en equilibrio (+/-30%) entre el líquido extracelómico y la sangre materno.

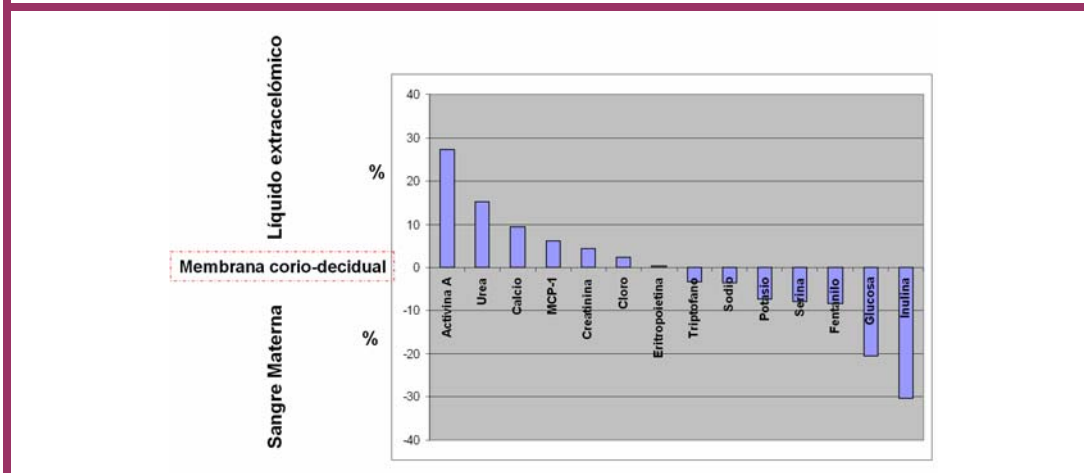


Tabla 20. Moléculas que han sido descritas en gradiente mayor al 30% entre el líquido extracelómico y la sangre materna, medida en gestaciones humanas durante el primer trimestre de gestación

Moléculas	Unidades	Media LEC	Media SM	Edad gestacional (semanas)	Nº	Referencia
α -HCG libre	(mIU/ml)	122495	69,6	7-12	18	(184)
β -HCG libre	(mIU/ml)	1398	48,2	7-12	23	(184, 185)
α -HCG total	(mIU/ml)	1336656	68232	7-8	5	(185)
Alfa-fetoproteína	(kIU/l)	21816	1,4	8-14	30	(154)
Progesterona	(pg/ml)	877	69,7	5-7	25	(179)
Vitamina B12	(ng/ml)	3680	405	9-12	22	(136)
Receptor soluble de TNF p55	(ng/ml)	4,52	0,54	8-10	21	(186)
Cobalamina	(ng/ml)	3162	427	9-12	22	(136)
Proteína placentaria 14	(ng/l)	4416	642	8-12	27	(187)
17- β estradiol	(nmol/l)	25,8	4,23	8-12	12	(188)
Estradiol	(pg/ml)	26978	4448	5-7	25	(179)
Ferritina	(μ g/l)	287	49	7-13	36	(189)
β 2-microglobulina	(mg/l)	4,7	0,9	7-12	25	(135)
Lisina	(μ mol/l)	703	141	7-11	17	(190)
Inhibina B	(pg/ml)	24,32	5,94	8-10	23	(182)
Arginina	(μ mol/l)	204	54	7-11	17	(190)
Alanina	(μ mol/l)	742	247	7-11	17	(190)
Metionina	(μ mol/l)	47	16	7-12	40	(175, 191)
β -HCG total	(kIU/ml)	410	141,5	7-12	16	(192)
Prolina	(μ mol/l)	289	104	7-11	17	(190)
Receptor soluble de TNF p75	(ng/ml)	4,72	1,71	8-10	21	(186)
Estriol no conjugado	(nmol/l)	2,6	1,0	8-12	27	(187)
HCG total	(IU/l)	174	67,3	5-13	30	(154)
Fenilalanina	(μ mol/l)	130	55	7-11	17	(190)
Ornitina	(μ mol/l)	112	48	7-11	17	(190)
Treonina	(μ mol/l)	289	124	7-11	17	(190)

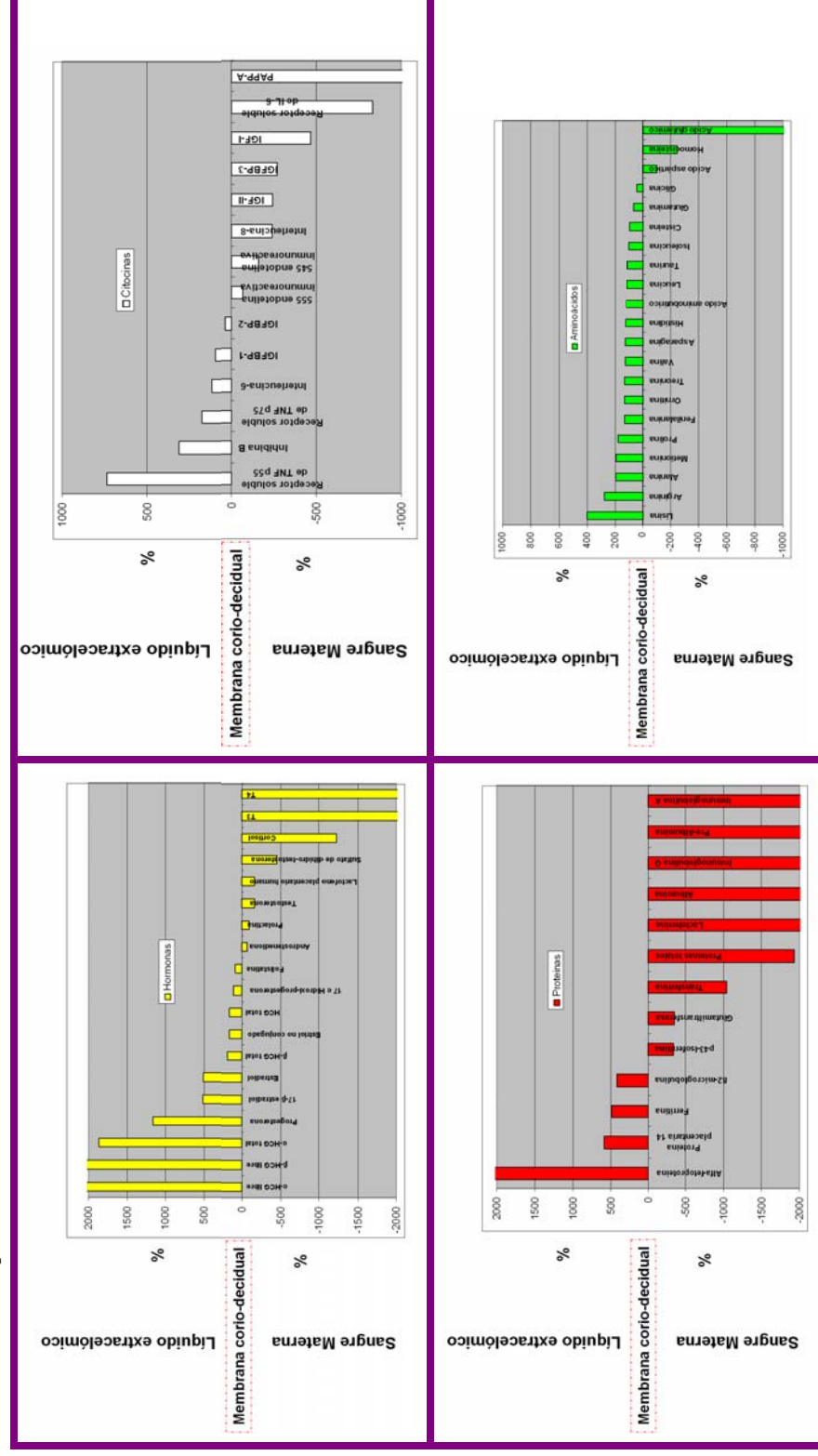
Tabla 20 continuación. Moléculas que han sido descritas en gradiente mayor al 30% la sangre materna y el líquido extracelómico, medidas en gestaciones humanas durante el primer trimestre de gestación.

Moléculas	Unidades	Media LEC	Media SM	Edad gestacional (semanas)	Nº	Referencia
Valina	($\mu\text{mol/l}$)	403	174	7-11	17	(190)
Asparagina	($\mu\text{mol/l}$)	101	44	9-12	17	(190)
Histidina	($\mu\text{mol/l}$)	170	75	7-11	17	(190)
Acido aminobutírico	($\mu\text{mol/l}$)	33	15	7-11	17	(190)
Interleucina-6	(pg/ml)	87,5	40	7-12	16	(180)
Leucina	($\mu\text{mol/l}$)	221	104	7-11	17	(190)
17 α Hidroxi-progesterona	(nmol/l)	33,3	16	8-12	12	(188)
Taurina	($\mu\text{mol/l}$)	191	92	7-11	17	(190)
Lactato	(mmol/l)	0,6	0,3	7-14	55	(172)
Isoleucina	($\mu\text{mol/l}$)	101	51	7-11	17	(190)
IGFBP-1	($\mu\text{g/l}$)	150	76	6-12	21	(193)
Cisteina	($\mu\text{mol/l}$)	91	47	7-11	17	(190)
Folistatina	(pg/ml)	11,72	6,35	8-11	27	(183)
Glutamina	($\mu\text{mol/l}$)	694	424	7-11	17	(190)
Folato	($\mu\text{g/ml}$)	9,9	6,2	9-12	22	(136)
Nicotina	(ng/ml)	108	72	7-11	23	(194)
Fosfato	(mmol/l)	1,61	1,10	7-12	32	(172, 178)
IGFBP-2	($\mu\text{g/l}$)	167	123	6-12	21	(193)
Glicina	($\mu\text{mol/l}$)	251	175	7-11	17	(175)

Tabla 21. Moléculas que han sido descritas en gradiente mayor al 30% entre la sangre materna y el líquido extracelómico, medida en gestaciones humanas durante el primer trimestre de gestación

Moléculas	Unidades	Media LEC	Media SM	Edad gestacional (semanas)	Nº	Referencia
Citrulina	($\mu\text{mol/l}$)	10	16	7-11	17	(190)
555 endotelina inmunoreactiva	(pg/ml)	18,6	31,1	7-12	15	(195)
Androstenediona	(nmol/l)	5,3	9	5-13	12	(188)
Prolactina	(IU/ml)	371	709	9-12	26	(196)
Acido aspártico	($\mu\text{mol/l}$)	6	12	7-11	17	(190)
545 endotelina inmunoreactiva	(pg/ml)	9,7	25,4	7-12	15	(195)
Testosterona	(nmol/l)	0,84	2,2	8-12	12	(188)
Lactofeno placentario humano	(ng/ml)	80	210	8-12	27	(187)
Interleucina-8	(pg/ml)	9,72	33,1	8-11	27	(180)
IGF-II	($\mu\text{g/l}$)	199	687	6-12	21	(193)
Homocisteína	($\mu\text{mol/l}$)	2,5	8,7	8-12	23	(191)
Hierro	($\mu\text{mol/l}$)	4,8	21	7-13	36	(189)
p43-Isoferritina	(U/ml)	5	22	7-12	25	(197)
Glutamilttransferasa	(U/l)	2	9			
Sulfato de dihidro-testosterona	($\mu\text{mol/l}$)	0,9	5	8-12	12	(188)
IGF-I	($\mu\text{g/l}$)	41	233	6-12	21	(193)
Receptor soluble de IL-6	(ng/ml)	4,01	37,4	8-10	21	(186)
Transferrina	(g/l)	0,22	2,5	7-13	36	(189)
Cortisol	(nmol/l)	33,3	441,7	8 -12	12	(188)
Acido glutámico	($\mu\text{mol/l}$)	5	76	7-11	17	(190)
Relaxina	(pg/ml)	57,5	1085	8-11	22	
Proteínas totales	(g/l)	3,5	71,3	5-13	30	(154)
Vitamina A	($\mu\text{mol/l}$)	0,08	1,85	9-12	15	(198)
Lactoferrina		2	49	7-13	36	(189)
Albumina	(g/l)	1,7	45,5	8-14	57	(102)
Inmunoglobulina G	(mg/dL)	32	907	6-12	34	(199)
Pre-Albumina	(g/l)	0,04	1,14	8-14	57	(102)
PAPP-A	(mIU/l)	26	1220	8-10	15	(200)
T3	(nmol/l)	0,03	1,70	6-12	12	(201)
Vitamina E	($\mu\text{mol/l}$)	0,26	17,01	9-12	15	(198)
Inmunoglobulina A	(mg/dL)	1	122	7-12	34	(199)
T4	(nmol/l)	0,96	145	6-12	12	(201)

Figura 41. Gradiente de concentración entre líquido extracelómico y sangre materna en hormonas, proteínas y aminoácidos, que no se encuentran en equilibrio entre ambos compartimentos.



5.5. Estudios en animales de experimentación.

5.5.1. Validación del modelo animal babuino gestante como sustituto de la gestación humana, para los estudios de diagnóstico prenatal y de trasplante *in utero* de células madres hematopoyéticas a embriones preinmunes

5.5.1.1. Estudios ecográficos durante el primer trimestre del desarrollo embrionario.

Con el objetivo de validar el modelo animal babuino, se realizó un análisis comparativo en gestantes humanas (entre 42 y 58 días postfecundación) y babuinos (entre los 35 y 47 días postfecundación), de los distintos marcadores ecográficos utilizados, de forma habitual, durante el primer trimestre del desarrollo embrionario: longitud cráneo-caudal; diámetro medio del saco gestacional (SG), saco amniótico (SA) y saco vitelino; porcentaje del

espacio extracelómico, como resultado del cálculo $\frac{SG - SA}{SG} \times 100$; así como la frecuencia cardíaca embrionaria; estableciendo como común denominador los estadios de Carnegie del desarrollo embriológico, para cada una de las variables estudiadas. La **tabla 22** describe la evolución de los distintos marcadores ecográficos entre los estadios 17 y 23 de Carnegie, tanto en humanos como en babuinos. Cada una de las variables de la tabla fueron representadas en las **figuras 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48**.

Se observó que la evolución ecográfica de ambas especies, en relación a los parámetros utilizados durante los estadios 17 y 23 de Carnegie es similar, haciendo comparable la valoración ecográfica de humanos con la que se realiza en el modelo animal seleccionado.

Tabla 22. Parámetros ecográficos del primer trimestre de gestación, medidos en gestante humanas y babuinos, durante los estadios de Carnegie 17-23.

Estadios de Carnegie		17	18	19	20	21	22	23
Humano	Días postfecundación	42	44	48	52	54	55	58
Nº de casos	86	4	8	12	18	15	14	15
LCC	(mm)	12,3	15,1	17,4	20,2	23	25	29,2
SG	(mm)	44,1	47,3	51,2	52,8	57	58,8	61,3
SA	(mm)	3,9	7,3	11	15,4	19,8	23,5	26,2
EEC	(%)	91,2	84,6	78,5	70,8	65,3	60,0	57,3
SV	(mm)	4,2	4,6	5	5,6	6	6,1	6,3
FC	(lpm)	160	148	141	160	157	175	178
Babuinos	Días postfecundación	35	37	39	41	43	45	47
Nº de casos	18	1	2	3	3	3	3	3
LCC	(mm)	12	13	17,6	18,1	19,2	22,6	26
SG	(mm)	41,35	43,79	46,23	48,67	51,11	53,55	55,99
SA	(mm)	2,86	6,5	10,14	13,78	17,42	21,06	24,7
EEC	(%)	93,1	85,2	78,1	71,7	65,9	60,7	55,9
SV	(mm)	3	3,1	3,9	4	4,3	5	5
FC	(lpm)	157	158	162	160	149	179	166

Los resultados se expresan en medias. LCC: longitud cráneo-caudal; SG: saco gestacional; SA: saco amniótico; EEC: espacio extracelómico; SV: saco vitelino; FC: frecuencia cardíaca; lpm: latidos por minuto.

Figura 42. Evolución de los días postfecundación en humanos y babuinos en función a los estadios de Carnegie del desarrollo embrionario.

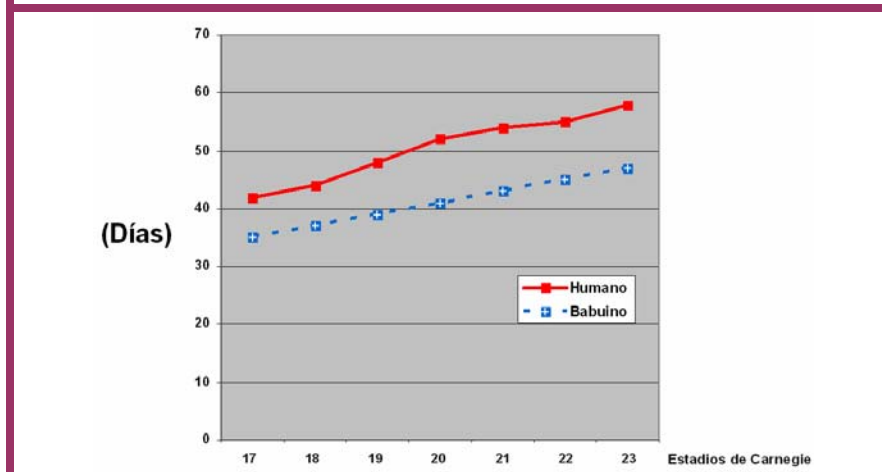


Figura 43. Evolución de la longitud cráneo-caudal medida por ecografía, en humanos y babuinos, en función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación para cada especie.

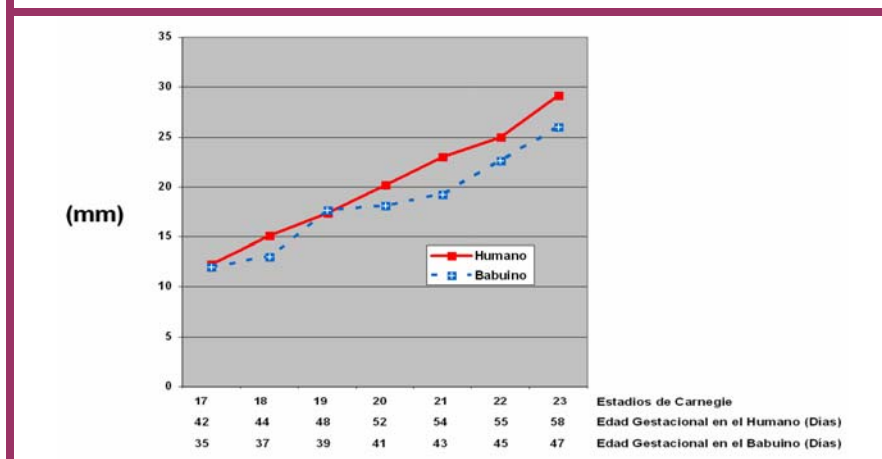


Figura 44. Evolución del saco gestacional medido por ecografía, en humanos y babuinos, en función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación para cada especie.

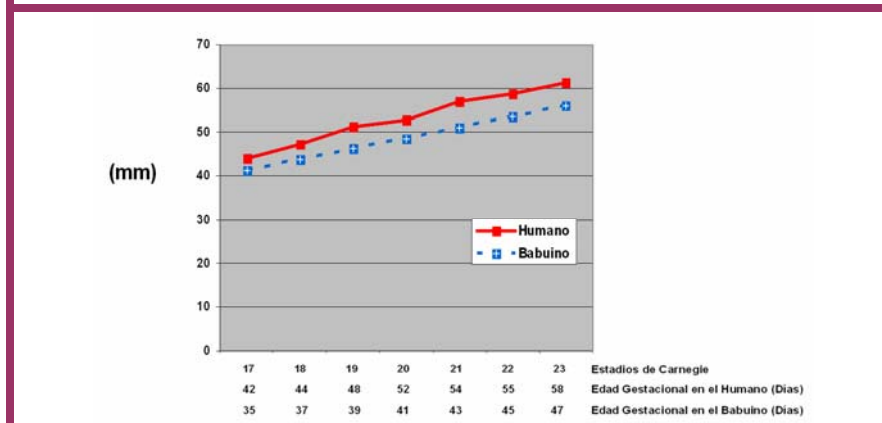


Figura 45. Evolución del saco amniótico medido por ecografía, en humanos y babuinos, en función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación para cada especie.

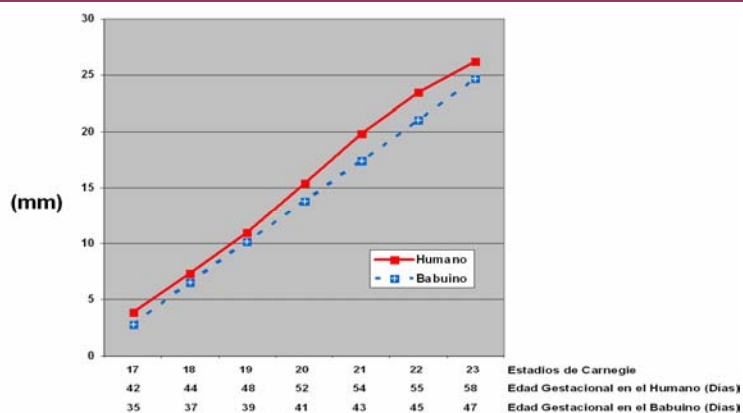


Figura 46. Evolución del porcentaje del espacio extracelómico, medido por ecografía, en humanos y babuinos, en función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación para cada especie.

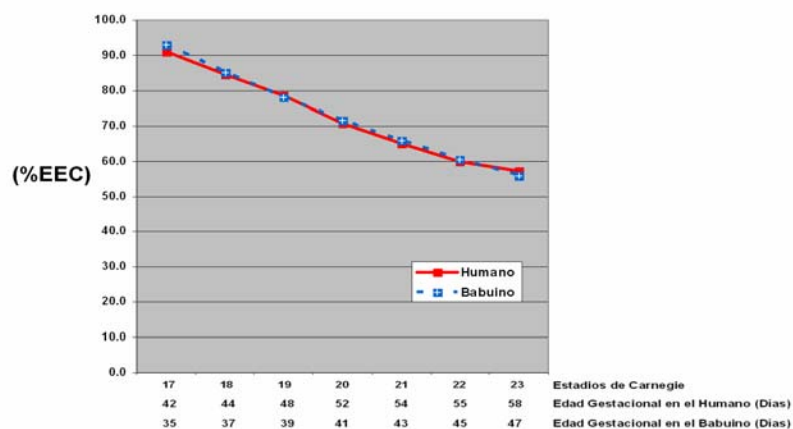


Figura 47. Evolución del saco vitelino, medido por ecografía en humanos y babuinos, en función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación según especie.

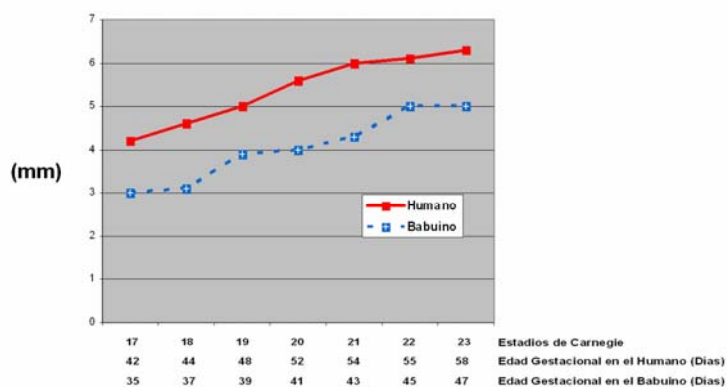
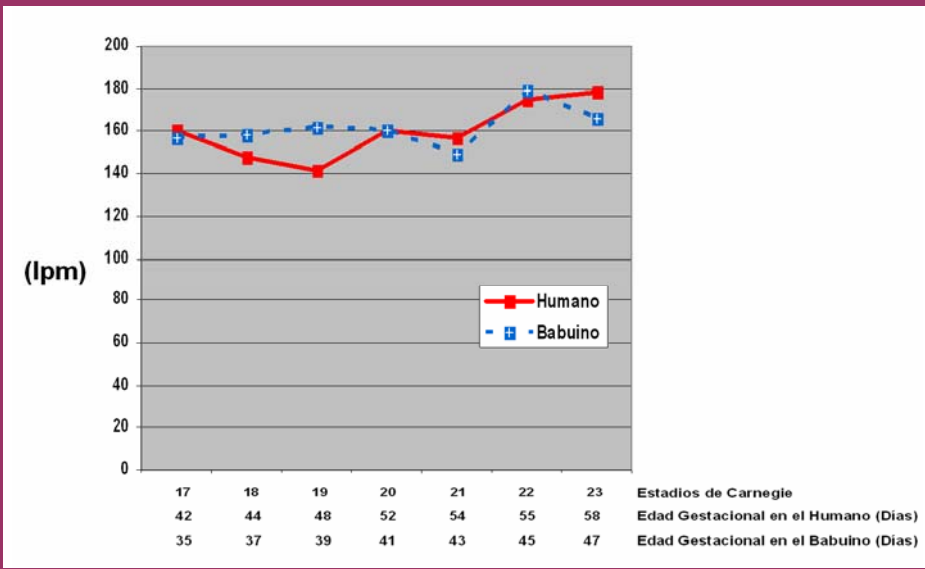


Figura 48. Evolución del latido cardíaco embrionario, medido por ecografía en modo M, en humanos y babuinos, función a los estadios de Carnegie y los días postfecundación según especie.



5.5.1.2. Estudios ecográficos durante el primer, segundo y tercer trimestre de desarrollo gestacional

Con el mismo objetivo del apartado anterior, se realizó un análisis comparativo del desarrollo ecográfico gestacional, entre ambas especies, basados en la LCC, la circunferencia cefálica, el diámetro biparietal, la circunferencia abdominal, y la longitud femoral, medidos en el 25%, 50%, 75% y 100% del tiempo total de la gestación, en humanos y en babuinos. El cálculo del peso fetal estimado, en ambas especies, se obtuvo a partir de la ecuación que define la curva de Hadlock para la estimación del peso fetal, tal y como se describe en el apartado 4.4.4 de sujetos y métodos de estudio.

Tabla 23. Evolución de los parámetros ecográficos calculados en los días que representan el 25%, 50%, 75% y 100% del tiempo total de gestación, en humanos y babuinos.

Porcentaje del periodo gestacional		25 %	50 %	75 %	100% (Parto)
Humano	Días postfecundación	73	147	220	294
Número	147	86	16	15	30
LCC	(mm)	33	-	-	-
CC	(mm)	-	206 ± 7*	310 ± 10	366 ± 11
DBP	(mm)	-	54,5 ± 0,2	79,6 ± 0,3	97,7 ± 0,4
LF	(mm)	-	48 ± 0,1	63,3 ± 0,8	77,3 ± 1
CA	(mm)	-	186 ± 14,3	297 ± 16,1	356 ± 18,7
FC	(lpm)	168 ± 10	158 ± 10	148 ± 11	146 ± 12
PFE	(grms)	-	525	1815	3207
Babuino	Días postfecundación	45	90	135	180
Número		9	9	6	49
LCC	(mm)	22,6	-	-	-
CC	(mm)	-	171 ± 2,8	237 ± 3,6	-
DBP	(mm)	-	45,6 ± 0,7	58,2 ± 0,8	-
LF	(mm)	-	38,7 ± 0,4	49,1 ± 0,6	-
CA	(mm)	-	135 ± 1,7	210 ± 2	-
FC	(lpm)	156 ± 12	160 ± 9	165 ± 10	167 ± 8
PFE	(grms)	-	262	651	901

Los resultados se expresan en medias. LCC: Longitud Cráneo-Caudal; CC: Circunferencia Cefálica; DBP: Diámetro Bi-parietal; LF: Longitud Femoral; CA: Circunferencia Abdominal; FC: Frecuencia Cardíaca; PFE: Peso Fetal Estimado

Las **figuras 49, 50, 51 y 52** representan las fichas ecográficas registradas en uno de los animales a los 37, 67, 111 y 140 días postfecundación. Es estas fichas se recogen las variables ecográficas más relevantes, así como fotografías de la punción en el espacio extracelómico, la inyección de las células hCD34+, visualizable por el signo de la burbuja, el estudio doppler cardíaco, del cordón umbilical, los vasos hepáticos y la arteria cerebral media, así como otros detalles ecográficos de interés.

Figura 49 Fichas Ecográfica de uno de los animales gestantes a los 37 días postfecundación.

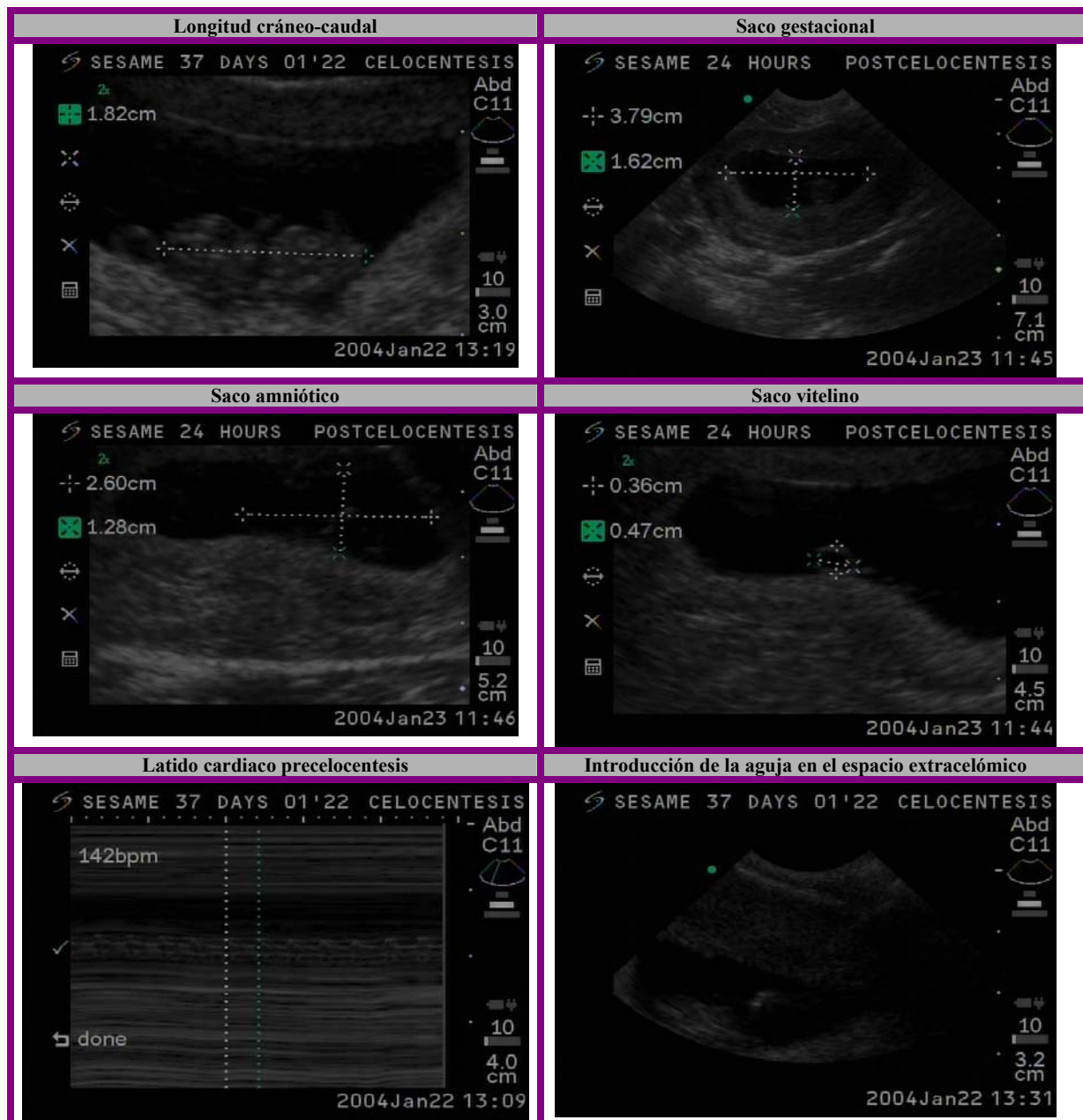


Figura 49, continuación. Fichas Ecográfica de uno de los animales gestantes a los 37 días postfecundación.

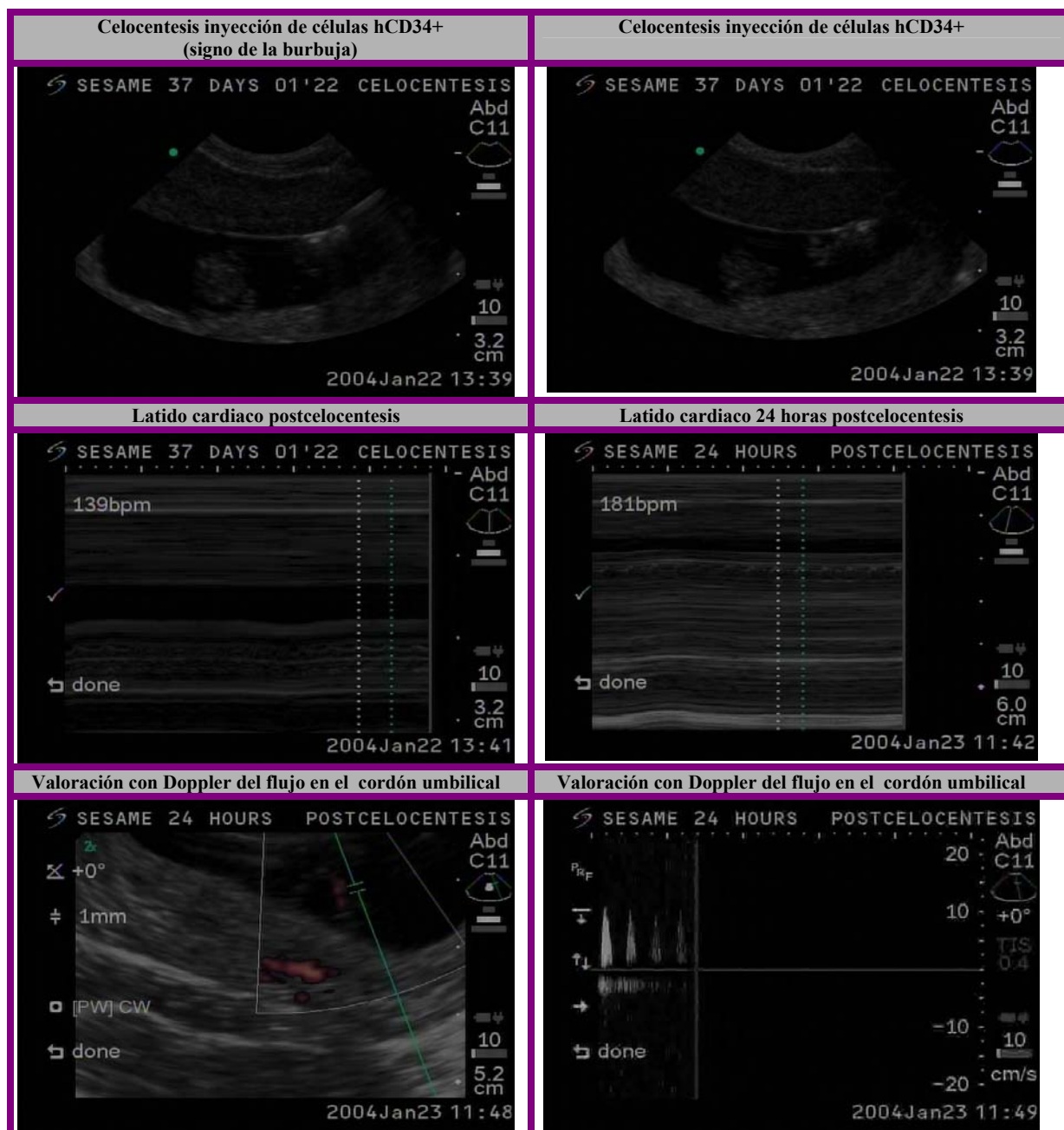


Figura 50. Fichas Ecográfica de uno de los animales gestantes a los 67 días postfecundación

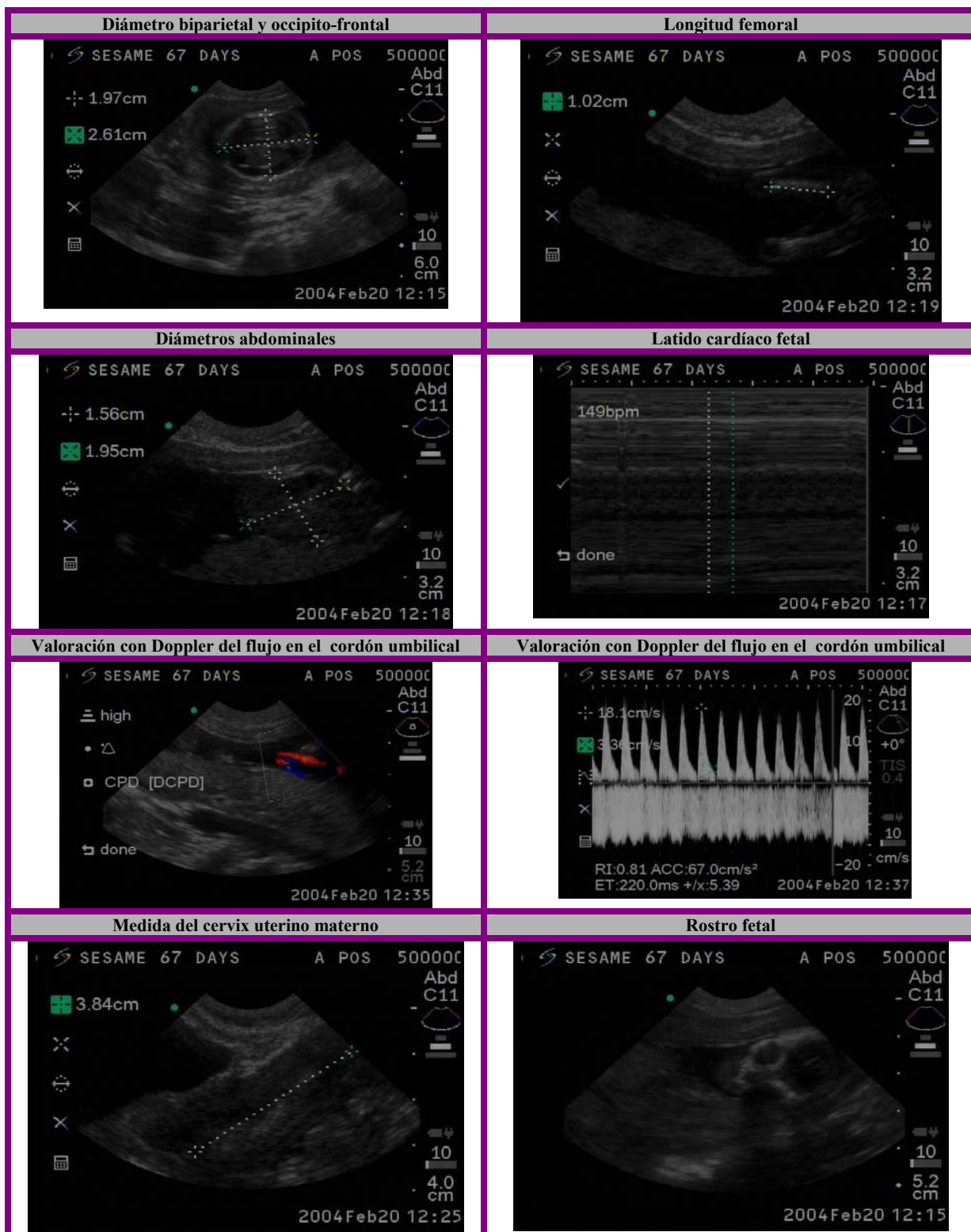


Figura 51. Fichas Ecográfica de uno de los animales gestantes a los 111 días postfecundación

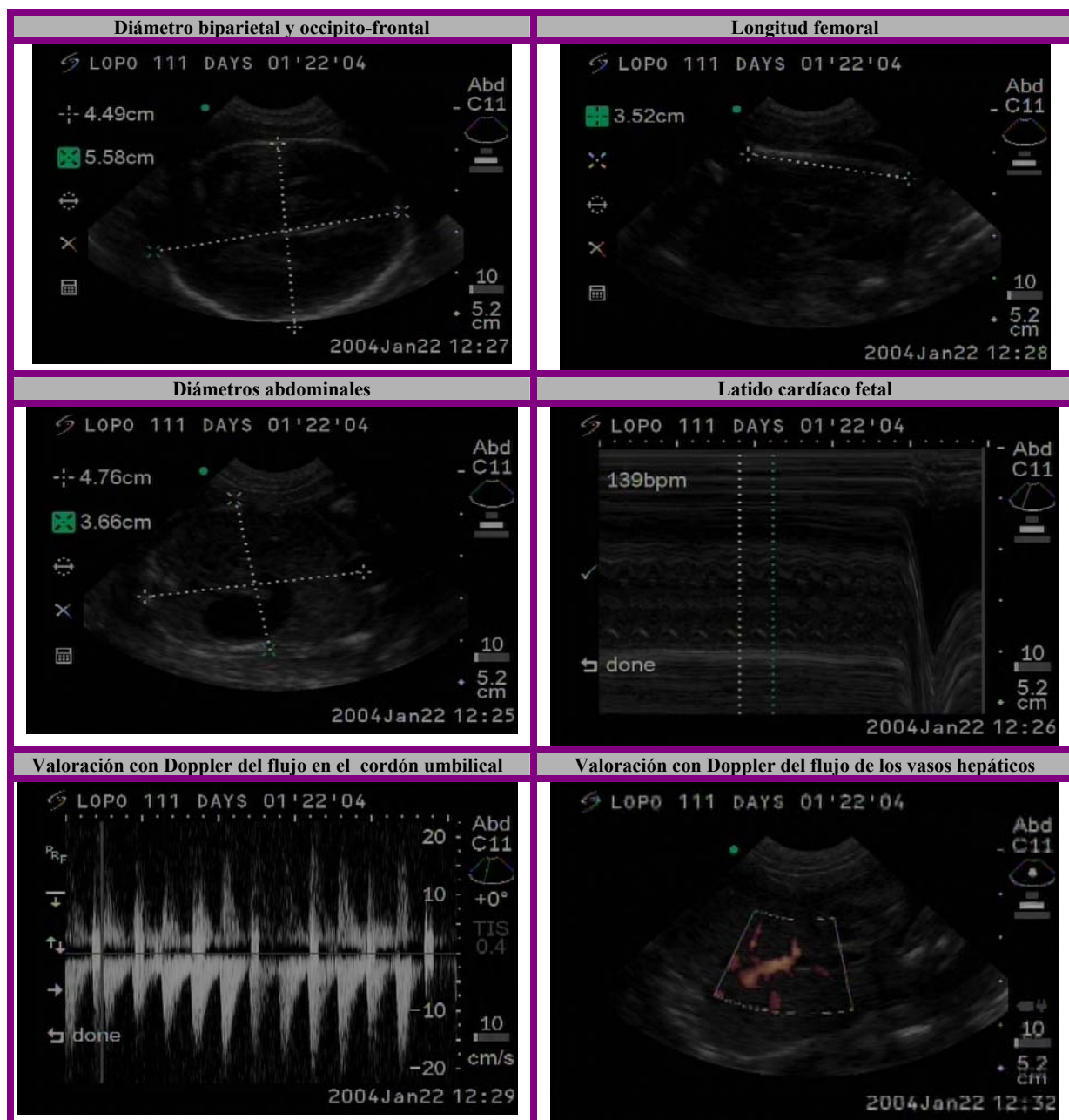
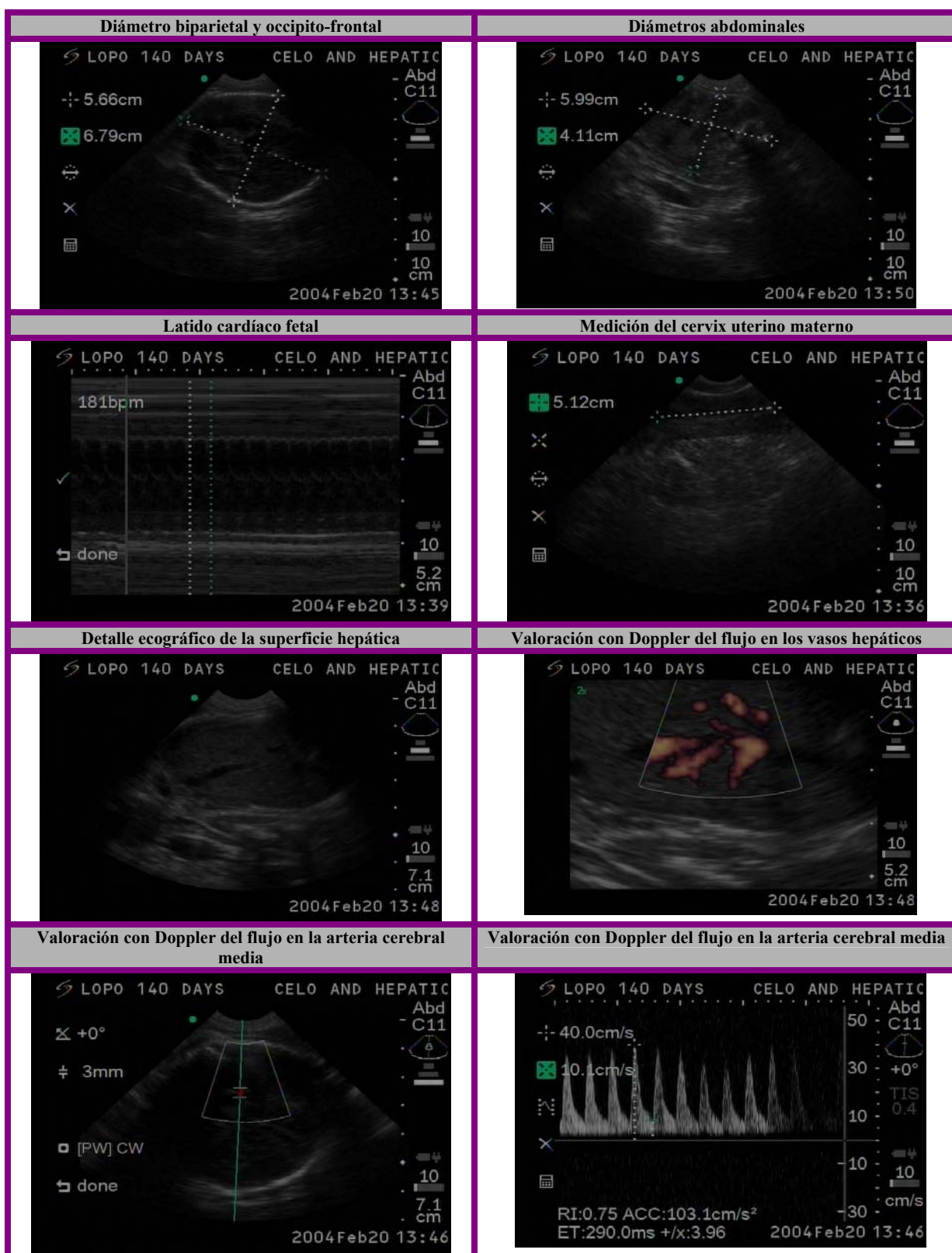


Figura 52. Fichas Ecográfica de uno de los animales gestantes a los 140 días postfecundación



Como se ha observado en el apartado en los estudios ecográficos realizados durante el primer trimestre de gestación, el desarrollo embrionario, tanto en humanos, como en babuinos, es muy similar. Sin embargo, conforme avanza la gestación, los parámetros ecográficos evaluados durante el segundo y tercer trimestre, presentaron diferencias entre ambas especies, en el 50% y 75% del tiempo total de gestación, aunque no pudo demostrarse un nivel de significación debido al reducido número de animales explorados en cada estadio. Debido a las diferencias encontradas, la curva de Hadlock para la estimación del peso fetal en humanos, utilizando la media de la CC, DBP, LF y CA (expresados en cm), no resulta útil para valorar el peso fetal en los babuinos, pero nos daría una referencia, en el caso de trasplantar células madre hematopoyéticas al feto, del número de células/Kg de peso que se inyectan en el modelo animal.

5.5.1.3. Control de los valores hematológicos en babuinos durante la gestación.

De forma habitual, tras realizar un hemograma a un paciente, cada una de las variables viene acompañada de un rango de valores, que representan el intervalo de confianza del 95% de la media de dicho valor, del conjunto de pacientes considerados sanos. Basados en dicho rango, fueron controladas cada una de las variables hematológicas del babuino, en distintos momentos de la gestación.

La **tabla 24** describe la media de los valores de los hemogramas realizados en 9 animales en distintos períodos, durante la gestación, utilizando como control el intervalo de confianza del 95% de la media de cada valor en individuos humanos sanos. La media del porcentaje de neutrófilos y monocitos se mantuvo elevada en todas las mediciones, sin embargo, este incremento no se correspondió con un aumento en el número total de dichas células. A pesar del reducido número de muestras para el análisis, se observó, que los parámetros hematológicos del babuino pueden ser controlados mediante los valores de referencia utilizados habitualmente en humanos, pudiéndose detectar, citopenias, anemias u otras anomalías con interés clínico-experimental.

Tabla 24. Evolución de los parámetros hematológicos medidos en babuinos durante la gestación.

Test	Media de valores en el babuino según días					Unidades	Valores de referencia en humanos (95% I.C.)	
	40 días	41 días	70 días	140 días	180 días			
Leucocitos	9,72	8,54	9,3	8,0	13,2	10 ³ /UL	4,8	10,8
Eritrocitos	4,61	4,88	4,5	4,03	4,62	10 ⁶ /UL	4,2	6,1
Hemoglobina	12,08	12,64	12,2	11,3	12,9	g/dL	12	18
Hematocrito	37,54	39,66	36,9	34,7	39,9	%	36	52
Volumen corpuscular medio	77,72	81,18	81,6	86,1	86,5	fL	80	99
Hemoglobina corpuscular media	25,82	25,86	27,1	28,0	27,9	Pg	27	31
Plaquetas	302,29	317,20	233,5	273	319	10 ³ /UL	130	400
Volumen plaquetario medio	9,56	25,70	9,0	10,0	9,2	fL	7	11
% Neutrofilos	71,36	71,36	77,8	83,5	84,2	%	43	65
% Linfocitos	25,22	25,56	19,7	14,1	12,3	%	20,5	45,5
% Monocitos	2,48	2,30	2,1	0,6	0,7	%	5,5	11,7
% Eosinófilos	0,80	0,70	0,5	1,8	1,7	%	0,9	2,9
% Basófilos	0,04	0,10	0,1	0,1	1,1	%	0,3	1
Nº Neutrofilos	7,47	6,08	7,3	6,8	10,2	10 ³ /UL	1,3	7,3
Nº Linfocitos	2,20	2,22	1,8	1,1	1,5	10 ³ /UL	0,4	5,1
Nº Monocitos	0,30	0,18	0,2	0,1	0,1	10 ³ /UL	0	2,5
Nº Eosinófilos	0,06	0,06	0,1	0,1	0,2	10 ³ /UL	0	1,5
Nº Basófilos	0,01	0,01	0,1	1,0	0,1	10 ³ /UL	0	0,5

Se resaltan en letra negrita los valores medios que no se encuentran dentro del intervalo de confianza de referencia en humanos.

5.5.1.4. Estudio de las variables perinatales en humanos-babuinos.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables edad gestacional y peso neonatal en la población de neonatos humanos, nacidos de gestaciones únicas a término y sin complicaciones perinatales, pertenecientes a la ciudad de Amarillo (Texas, EEUU), nacidos entre enero de 2.001 y diciembre de 2.002, y la población de neonatos babuinos nacidos a término y sin complicaciones perinatales, pertenecientes a la colonia de la Universidad de Oklahoma (Oklahoma, EE.UU.) nacidos entre agosto de 2.001 y agosto de 2.003. La **tabla 25** y la **figura 53** describen la distribución de la edad gestacional y peso neonatal en ambas especies. Al igual que ocurre en las gestaciones humanas a término, en el babuino, el peso neonatal es dependiente de la edad gestacional siguiendo una relación directamente

proporcional entre ambas variables (**Figura 54**). En la gráfica se representa la recta de regresión y los intervalos de confianza del 95% de la media de la recta de regresión. Se describe, además, la fórmula de la recta de regresión entre ambas variables.

Como se demostró en el apartado 5.1.1 estos resultados pueden ser utilizados como normogramas, para cada una de las variables, y así comparar, en su correspondiente especie y en función de la edad gestacional y el peso neonatal, los resultados obtenidos en la muestra de estudio.

Tabla 25. Edad gestacional y peso neonatal de recién nacidos humanos y babuinos.

Modelo	Variable	Media	D.T	Intervalo de confianza del 95%	
Humano (N: 5.786)	Edad gestacional (días de embarazo)	271,84	8,9	271,2	272,4
Babuino (N:49)	Edad gestacional (días post fecundación)	180,48	5,61	178,17	182,79
Humano (N: 5.786)	Peso neonatal (Kg)	3,42	0,4	3,41	3,43
Babuino (N:49)	Peso neonatal (Kg)	0,90	0,11	0,86	0,94

Figura 53. Distribución, en diagrama de cajas, de las variables peso neonatal y edad gestacional tanto en humanos, como en babuinos

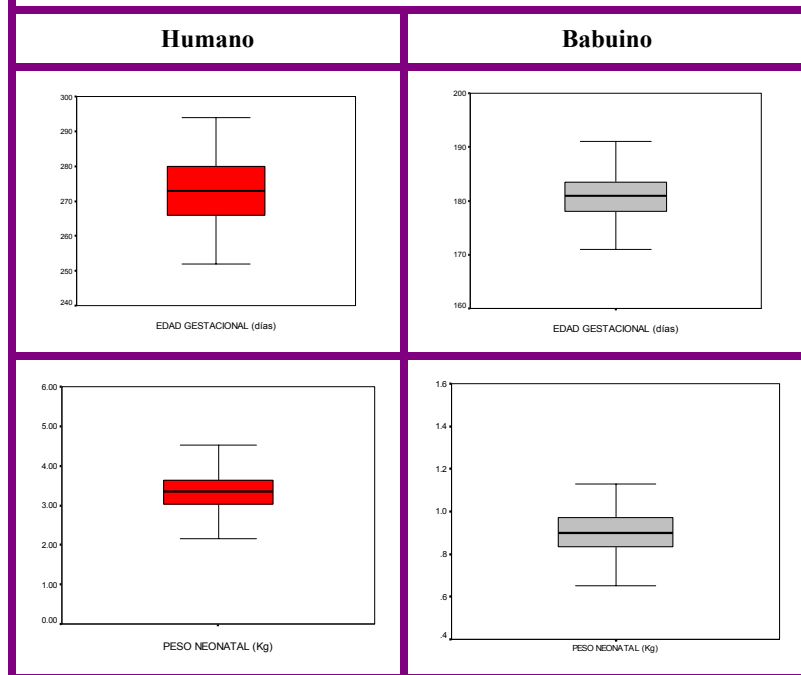
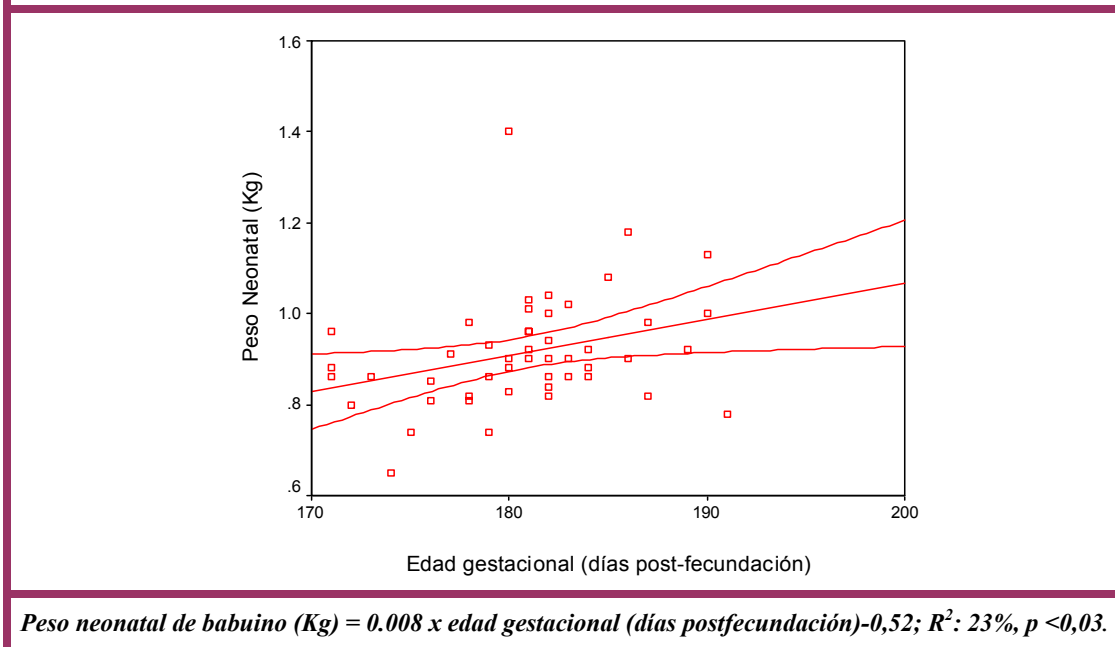


Figura 54. Correlación entre el peso neonatal y la edad gestacional en 49 recién nacidos babuinos pertenecientes a la colonia de la Universidad de Oklahoma.



5.5.1.5. Evolución de la curva de crecimiento ponderal de recién nacidos babuinos a término durante el primer semestre de vida postnatal

Con el objetivo de conocer el desarrollo ponderal de los recién nacidos babuinos a término, durante los primeros seis meses de vida postnatal, se analizó mensualmente el peso neonatal (Kg), hasta el sexto mes de vida, en los 49 babuinos descritos en el estudio anterior y que se representan en la **figura 55**.

Las curvas de crecimiento ponderal no fueron diferentes en función del sexo neonatal (**Figura 56**).

Ambas curvas, serían útiles para controlar la evolución ponderal de los recién nacidos babuinos en los que se han realizado experimentos de trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas humanas durante el periodo fetal.

Figura 55. Curva de crecimiento mensual, durante los primeros seis meses de vida postnatal, en 49 babuinos recién nacidos a término en la colonia de Oklahoma.

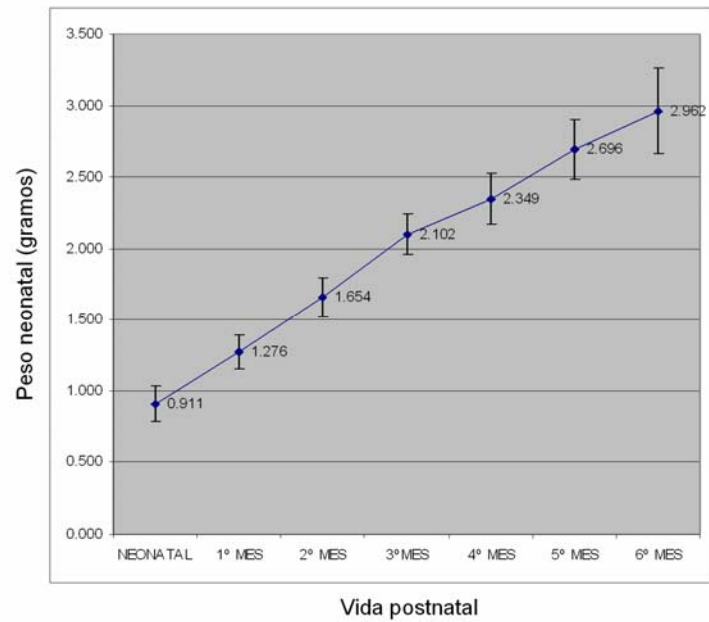
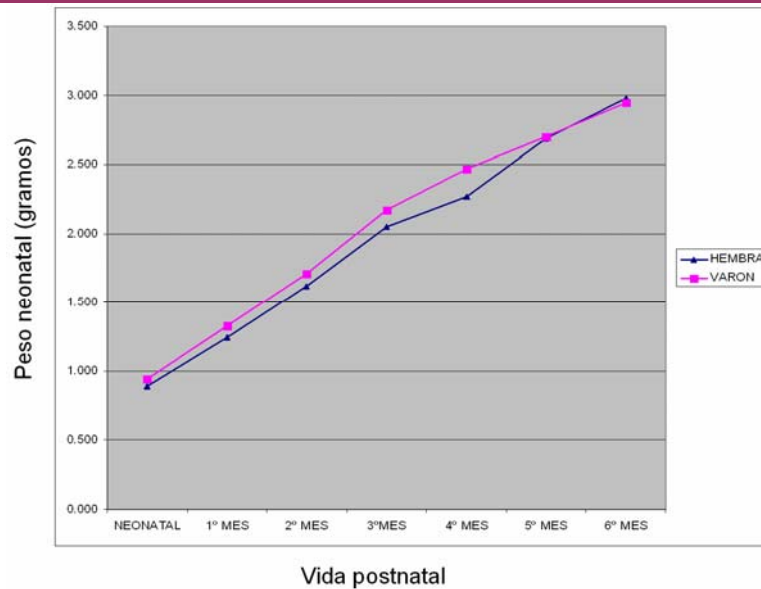


Figura 56. Curvas de crecimiento mensual durante los primeros seis meses de vida postnatal en función del sexo neonatal (25 hembras y 24 varones). No se encontraron diferencias ($p: 0,23$)



5.5.1.6. Optimización del análisis citogenético en las células procedentes del líquido extracelómico extraído de babuinos gestantes alrededor del día 40 postfecundación

Se realizó el análisis citogenético de las células procedentes del líquido extracelómico, extraído por celocentesis ecoguiada, en 9 babuinos gestantes, entre 36 y 44 días postfecundación. Para ello, se incubaron dichas células en dos condiciones diferentes de cultivo: **(A)** placas de 96 pocillos de fondo en “U” con 1 ml de medio de cultivo *Amniomax* (solución comercial que habitualmente se emplea para el cultivo de los amniocitos) y 1 ml de medio de cultivo para fibroblastos (N:4), y en **(B)** placas de cultivo de 24 mm x 30 mm con 1 ml de medio de cultivo *Amniomax* (N:5). Las células se cultivaron, en ambas condiciones, hasta obtener un número suficiente de células en metafase para poder realizar los estudios cromosómicos, de acuerdo a los estándares del American College of Medical Genetics (www.acmg.org).

De los 9 animales incluidos en el procedimiento, se produjeron 3 abortos, todos ellos dentro del grupo en el que se realizó el abordaje de forma transvaginal, entre las 24 y 72 horas posteriores a la realización del procedimiento. Del resto de los animales, 4 nacieron a término, con resultados perinatales dentro de la normalidad, según los normogramas de la institución. En el momento de la escritura de esta Memoria, el resto de las gestaciones se encontraban en curso, alrededor de los 120 días de gestación (a término: 180 días), sin presentar ningún tipo de complicación. No se observaron complicaciones materno-embriónicas. La media \pm D.T. de volumen de líquido extracelómico extraído y de tiempo de cultivo necesario para la realización de los estudios cromosómicos, fue de $1,85 \pm 0,3$ ml y $18,8 \pm 1,8$ días, respectivamente. La tasa de éxito del cultivo fue del 50% cuando la celocentesis se realizó por vía transvaginal, y del 100% cuando se realizó por vía transabdominal. En la **tabla 26** se describe el volumen de líquido extracelómico extraído, la vía de abordaje para la realización de la celocentesis, el tamaño de la aguja utilizada, las condiciones y los días de cultivo necesarios para realizar el análisis citogenético, así como el resultado del cariotipo y la evolución de los embarazos.

Tabla 26. Resultados del análisis citogenético de las células del líquido extracelómico, extraído por celocentesis ecoguiada en 9 babuinos gestantes alrededor del día 40 postfecundación.

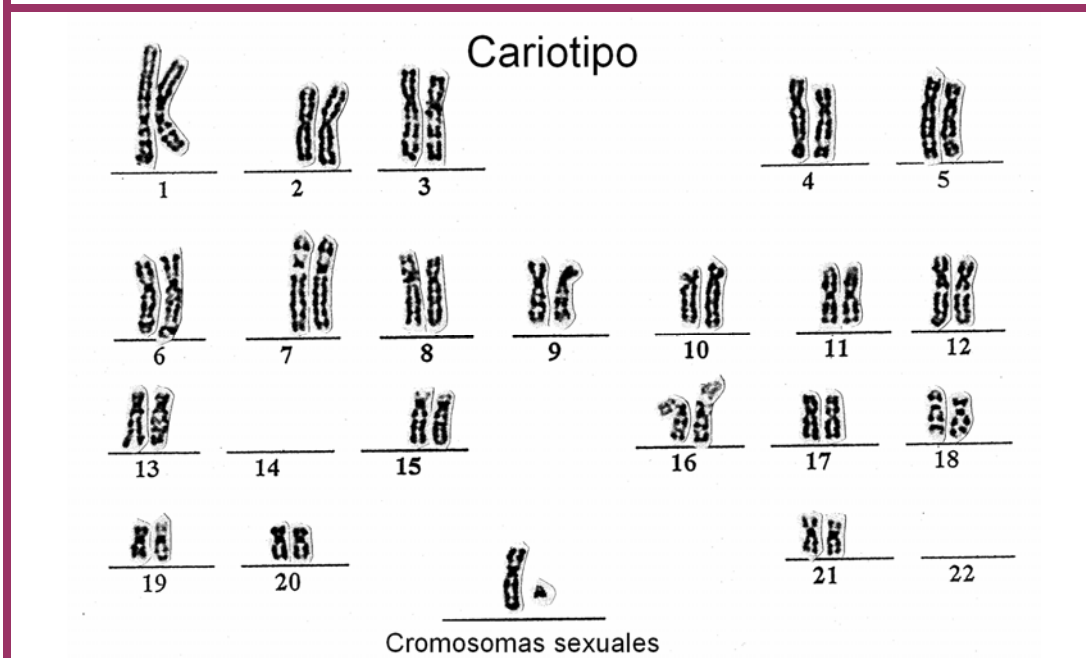
Animal	LEC (ml)	Abordaje (Tamaño de la aguja)	Condiciones de cultivo	Días	Cariotipo y evolución
5906	2	Transvaginal (18G)	A	20	42,XY Vivo y sano
6038	2	Transvaginal (18G)	A	-	Fallo Aborto
5907	2	Transvaginal (17G)	A	-	Fallo Aborto
6111	2	Transvaginal (18G)	A	20	42,XX Aborto
2685	2	Transabdominal (20G)	B	18	42,XX Vivo y sano
6145	2	Transabdominal (20G)	B	20	42,XY Vivo y sano
6762	1,5	Transabdominal (20G)	B	16	42,XX Vivo y sano
2997	2,5	Transabdominal (20G)	B	-	Fallo En curso
X894	1	Transabdominal (20G)	B	-	Fallo En curso

(A) 1 ml de medio de cultivo *Amniomax* + 1 ml de medio de cultivo para fibroblastos (B) 1 ml de medio de cultivo *Amniomax*.

En los estudios cromosómicos, a partir de las células del líquido extracelómico de uno de los animales (nº 6145), se confirmó el cariotipo del babuino (42 cromosomas: 20 pares de autosomas y 1 par sexual). Localizados en relación al ideograma humano estándar, de acuerdo

a las indicaciones del American College of Medical Genetics, no se identifican pares cromosómicos similares al 14 y 22 humanos (**Figura 57**).

Figura 57. Cariotipo (42,XY) del animal n° 6145, obtenido a partir de las células del líquido extracelómico.



5.5.1.7. Determinación de la concentración de hormonas y citocinas en sangre materna y líquido extracelómico extraído de babuinos gestantes alrededor del día 40 postfecundación

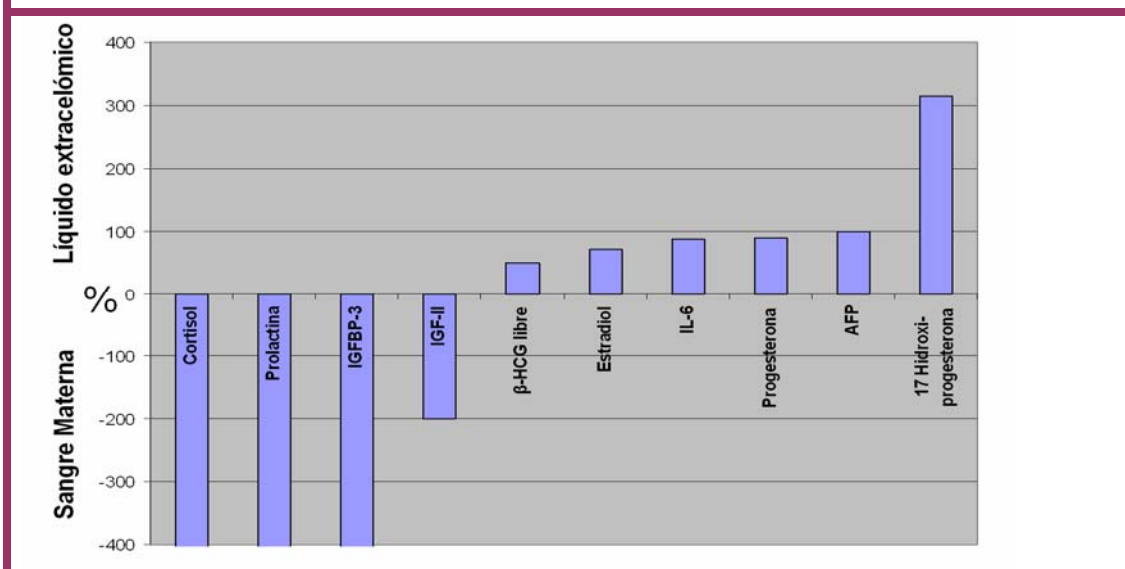
Se realizó un análisis de la concentración de las hormonas: 17 α hidroxiprogesterona, cortisol, estradiol, β -HCG libre, inhibina A, progesterona y prolactina, y las citocinas: IL-3, IL-6, IL-7 e IL-12, en las muestras de líquido extracelómico y sangre materna, de forma pareada, mediante un ensayo ELISA de alta sensibilidad. En la **tabla 27** se describe la media de las moléculas detectadas, de forma pareada, tanto en sangre materna, como en líquido extracelómico, en 3 animales. Se observó que la media de concentración del cortisol, la prolactina, el IGFBP-3 y el IGF-II, era muy superior en sangre materna respecto a la concentración presente en el líquido extracelómico. De las moléculas que presentan mayor concentración en líquido extracelómico, únicamente, la media de concentración de la 17 α hidroxiprogesterona representó más del doble, respecto a la presente en sangre materna (**Figura 58**).

Tabla 27. Hormonas y citocinas en sangre materna y líquido extracelómico, en 3 animales.

Moléculas	Unidades	Sangre materna	Líquido extracelómico
17 α Hidroxi-progesterona	ng/ml	0,86	3,57
Cortisol	μ g/dl	14,37	1,57
Estradiol	pg/ml	75,93	268,00
β -HCG libre	ng/ml	0,01	0,02
Progesterona	ng/ml	5,27	50,23
Prolactina	ng/ml	8,63	1,07
AFP	IU/MI	1,97	41123,00
IGF-II	μ g/ml	1104,33	368,00
IGFBP-3	μ g/ml	4,50	0,87
IL-6	pg/ml	0,27	2,30
IL-7	pg/ml	ND	ND
IL-12	pg/ml	32,60	ND

AFP: Alfa-fetoproteína; HCG: *human chorionic gonadotropin*; IGF: *Insulin-like growth factor*; IGF: *Insulin-like growth factor binding protein*; IL: interleucina. ND: No determinado.

Figura 58. Distribución del porcentaje del gradiente de concentración de las hormonas y citocinas entre el líquido extracelómico y la sangre materna, en babuinos gestantes alrededor de los 40 días postfecundación.



AFP: Alfa-fetoproteína; HCG: *human chorionic gonadotropin*; IGF: *Insulin-like growth factor*; IGF: *Insulin-like growth factor binding protein*; IL: interleucina. ND: No determinado.

Basado en estos resultados, se agrupó para cada molécula la media de concentración obtenida en el estudio realizado, tanto en sangre materna, como en el líquido extracelómico, con las referidas en gestaciones humanas, descritas en las **tablas 19, 20 y 21** en el apartado 5.4 de resultados.

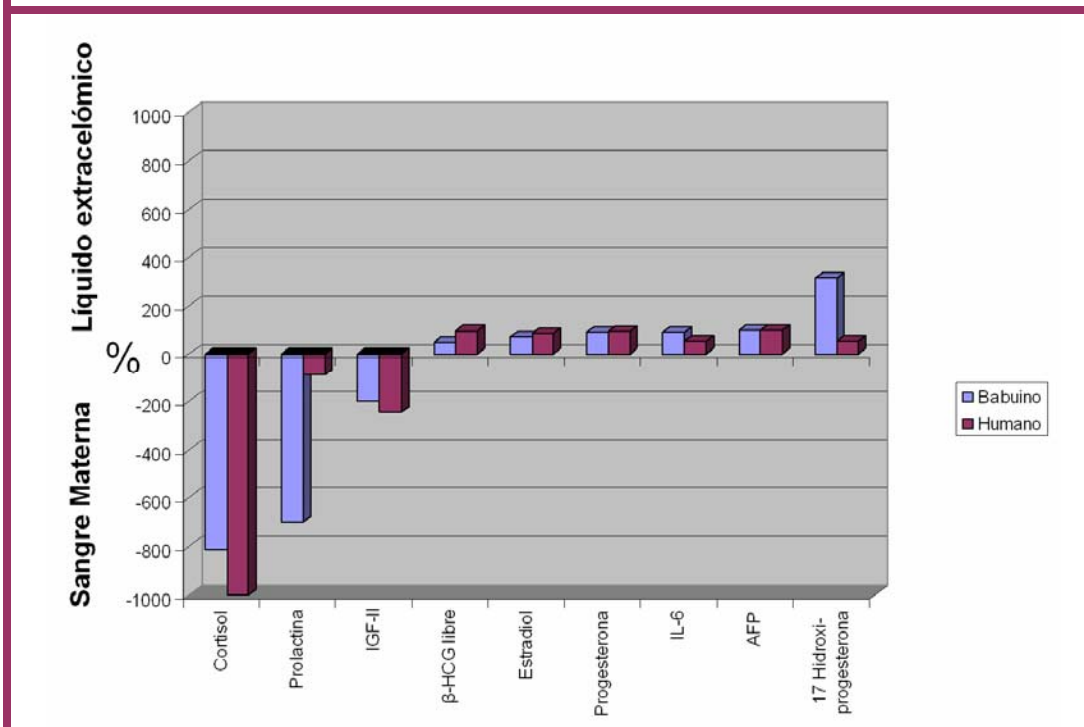
No se encontraron referencias en la literatura de que la IGFBP-3, la IL-7 y la IL-2 hubiesen sido medidas en gestaciones humanas. Respecto al resto de moléculas, a pesar de que algunas de ellas fueron medidas en distintas unidades, dependiendo del trabajo de procedencia, se encontró similitud en los gradientes de concentración entre ambos compartimentos, tanto en humanos, como en babuinos (**Tabla 28 y Figura 59**).

Tabla 28. Hormonas y citocinas en sangre materna y líquido extracelómico, en gestantes babuinos, alrededor de los 40 días postfecundación.

Moléculas	Unidades	SM	LEC	% (LEC-SM)	% (SM-LEC)	Modelo	Ref.
				SM	LEC		
17 α Hydroxyprogesterona	ng/ml	0,86	3,57	315,12		Babuino	
17 α Hydroxyprogesterona	nmol/l	16	33,3	51,95		Humano	(188)
Cortisol	μ g/dl	14,37	1,57		815,29	Babuino	
Cortisol	nmol/l	441,7	33,3		1226,42	Humano	(188)
Estradiol	pg/ml	75,93	268	71,67		Babuino	
Estradiol	pg/ml	4448	26978	83,51		Humano	(179)
β -HCG libre	ng/ml	0,01	0,02	50		Babuino	
β -HCG libre	mIU/ml	48,2	1398	96,55		Humano	(184, 185)
Progesterona	ng/ml	5,27	50,23	89,51		Babuino	
Progesterona	pg/ml	69,7	877	92,05		Humano	(179)
Prolactina	ng/ml	8,63	1,07		706,54	Babuino	
Prolactina	IU/ml	709	371		91,10	Humano	(196)
AFP	IU/ml	1,97	41123	100		Babuino	
AFP	kIU/l	1,4	21816	99,9		Humano	(154)
IGF-II	μ g/ml	1104,33	368		200,09	Babuino	
IGF-II	μ g/l	687	199		245,22	Humano	(193)
IL-6	pg/ml	0,27	2,3	88,26		Babuino	
IL-6	pg/ml	40	87,5	54,28		Humano	(180)
IGFBP-3	μ g/ml	4,5	0,87		417,24	Babuino	
IL-7	pg/ml	ND	ND	-	-	Babuino	
IL-12	pg/ml	32,6	ND	-	-	Babuino	

AFP: Alfa-fetoproteína; HCG: *human chorionic gonadotropin*; IGF: *Insulin-like growth factor*; IGF: *Insulin-like growth factor binding protein*; IL: interleucina. ND: No determinado. SM: sangre Materna y LEC: líquido extracelómico.

Figura 59. Distribución del porcentaje de gradiente de concentración de las hormonas y citocinas entre el líquido extracelómico y la sangre materna, en babuinos gestantes alrededor de los 40 días postfecundación, y en gestantes humanas durante el primer trimestre.



AFP: Alfa-fetoproteína; HCG: *human chorionic gonadotropin*; IGF: *Insulin-like growth factor*; IGF: *Insulin-like growth factor binding protein*; IL: interleucina. ND: No determinado.

5.5.1.8. Determinación de la concentración de hormonas y citocinas en sangre materna de babuinos gestantes alrededor del día 40 postfecundación antes y después de la celocentesis.

Finalmente se realizó un análisis de la concentración de las hormonas: 17 α hidroxiprogesterona, cortisol, estradiol, β -HCG libre, inhibina A, progesterona y prolactina, en las muestras de sangre materna, de forma consecutiva, antes y después de la celocentesis ecoguiada, en 7 babuinos gestantes entre 36 y 44 días postfecundación, mediante un ensayo ELISA de alta sensibilidad. No se observaron complicaciones materno-embrionarias. Tres de los fetos nacieron a término, y los cuatro animales restantes continuaron su embarazo más allá de los 120 días de gestación, con controles ecográficos normales. En la **tabla 29** se describen los resultados de cada una de las moléculas en media (D.T.) y valor mínimo y máximo, en

base al momento de extracción. Únicamente, se encontraron diferencias en la concentración de progesterona y prolactina entre ambos momentos ($p<0,05$).

Estos resultados podrían ser útiles para: controlar los posibles cambios resultantes en gestaciones que aborten tras la celocentesis, conocer si el trasplante *in utero* produce cambios en el ambiente hormonal.

Tabla 29. Concentración de las distintas hormonas en sangre materna antes y después de la celocentesis, realizada en 7 babuinos gestantes entre 36 y 44 días postfecundación.

Moléculas	Unidades	Momento	Media (D.T.)	Mínimo	Máximo
17 α Hidroxi-progesterona	(ng/ml)	Pre-celocentesis	1,76 (0,4)	0,62	2,6
		Post-celocentesis	1,82(0,4)	1,01	3,03
Cortisol	(μ g/dl)	Pre-celocentesis	18,8 (4)	7,8	24,7
		Post-celocentesis	21 (4)	14,7	31,8
Estradiol	(pg/ml)	Pre-celocentesis	78 (28)	36,5	215
		Post-celocentesis	84,6 (26,5)	38,4	208
β -HCG libre	(ng/ml)	Pre-celocentesis	0,02(0,01)	0,02	0,03
		Post-celocentesis	0,03(0,01)	0,02	0,03
Progesterona *	(ng/ml)	Pre-celocentesis	6,6(1,3)	4,3	12
		Post-celocentesis	12,2(3)	5,1	25,8
Prolactina*	(ng/ml)	Pre-celocentesis	7,55(1,5)	4,7	11,1
		Post-celocentesis	24,5(35)	11,9	37,9

HCG: *human chorionic gonadotropin* * Test de Wilcoxon para pruebas pareadas ($p<0,05$).

En resumen, basados en los hallazgos ecográficos, biométricos, hematológicos y bioquímicos, el modelo babuino se convierte en un excelente sustituto del humano, para los estudios de diagnóstico prenatal, fisiología y fisiopatología durante el periodo gestacional.

5.6. Trasplante de células madre hematopoyéticas CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos a embriones preinmunes vía celocentesis ecoguiada

5.6.1. Control de los parámetros ecográficos gestacionales antes y después de la celocentesis

En el protocolo de estudio de los animales de experimentación se explican todos y cada uno de los procedimientos necesarios, que se siguieron para llevar a cabo el trasplante de células madre hematopoyéticas hCD34+ en el espacio extracelómico de los babuinos gestantes (Ver anexo: protocolo de estudio en animales de experimentación). Por otra parte, basados en los resultados desfavorables tras realizar celocentesis por abordaje transvaginal, (ver **tabla 26** del apartado 5.5.1.6 de resultados), todas la celocentesis siguientes se realizaron por vía transabdominal mediante la técnica de doble operador.

Antes de realizar la celocentesis, todos los animales fueron evaluados ecográficamente con el objetivo de:

1. Diagnosticar el estado de la gestación, tras la visualización del saco gestacional, el embrión y el latido cardíaco embrionario.
2. Datar la gestación a través de los parámetros ecográficos embrionarios y extraembrionarios, siguiendo las curvas de normalidad previamente publicadas.
3. Localización del espacio extracelómico, y punto de entrada del catéter.

Tras preparar el punto de punción transabdominal, se procedió a realizar la celocentesis, con agujas de 20-22 g, y siempre bajo control ecográfico. No se observaron complicaciones materno-embrionarias inmediatamente después del procedimiento, se evaluó exhaustivamente el estado de la gestación, se registró la frecuencia cardíaca, se localizaron las células trasfundidas, se comprobó la integridad de la membrana amniótica y vitelina, y se descartó la aparición de sangrado tras la punción.

Al cabo de 24 horas, en uno de los embriones no logró detectarse el latido cardíaco y tras un examen ecográfico detallado, a excepción de la ausencia del latido, no se observó ningún signo que hiciera sospechar la posibilidad de traumatismo posterior a la punción, las variables fueron concordantes con las del día anterior, no se encontraron diferencias con el

resto de los animales estudiados, y no se observó evidencia ecográfica de daño embrionario o extraembrionario (**Tabla 30**).

Al cabo de 72 horas, la visualización del latido cardíaco embrionario estuvo a cargo del personal especializado de la Universidad de Oklahoma, quienes diagnosticaron la ausencia de latido cardíaco en otro de los casos. Ambas gestaciones interrumpidas abortaron al cabo de 96 horas. De los casos restantes, se obtuvieron tres recién nacidos a término (dos hembras y un macho), dos de ellos atendidos por cesárea y uno por vía vaginal, y otras tres gestaciones continúan su embarazo más allá de los 120 días de gestación, con controles ecográficos normales, en el momento en el que se escribe esta Memoria.

En general, a pesar de que se encontró cerca de un 10% de incremento en la media de la frecuencia cardíaca embrionaria a las 24 y 72 horas después del procedimiento, en comparación con el momento anterior a la celocentesis, esta diferencia no fue significativa ($p: 0,08$), ni se encontraron cambios en el resto de los parámetros antes o después de la celocentesis ($p > 0,05$)

Tabla 30. Datos ecográficos obtenidos en el periodo previo, inmediatamente posterior y 24 horas después de la celocentesis, en los 8 animales en los que se trasplantaron células hCD34+. Se describe la media y la desviación típica para cada una de las variables estudiada.

Animal	Edad (días)	LCC (mm)	Diámetro Medio del S.G. (mm)	Diámetro Medio del S. A. (mm)	Diámetro Medio del S. V (mm)	Frecuencia cardíaca fetal			Placenta
						Pre (lpm)	Post (lpm)	24 Horas (lpm)	
XCR5	36	12,90	31,97	11,77	3,60	149	153	ND	Post
C1396	44	18,00	37,10	20,27	5,30	149	179	181	Post
XCR4	39	16,60	29,33	16,77	3,90	181	162	168	Post
024	44	13,90	29,00	14,03	3,65	158	169	188	Fundus
CR963	37	17,40	25,60	18,77	4,35	139	158	181	Post
S104	38	23,00	28,03	21,73	5,50	160	170	169	Post
T88009	36	20,30	29,47	20,10	5,15	166	171	168	Ant
PC9502	42	25,50	37,27	26,20	4,45	149	179	181	Fundus
Media	39,50	18,50	30,97	18,73	4,50	156	165	175	
D.T	3,40	4,30	7,67	6,17	0,80	13	12	11	

5.6.2. Inyección de las células madre hematopoyéticas CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos a embriones preinmunes vía celocentesis ecoguiada

Tras el control ecográfico inicial, y una vez preparados el punto de punción y las células humanas a inyectar, se procedió a realizar la celocentesis ecoguiada, en cada uno de los animales. Basados en el hecho de que el grupo sanguíneo de los babuinos es 0 Rh-, se utilizaron células hCD34+ de un grupo sanguíneo distinto, y siempre Rh+. En un 37,5 % de los casos se utilizaron células hematopoyéticas (CD34+) del grupo 0 Rh+, en otro 37,5% de los animales se emplearon células del grupo A Rh+, y en el 25% restante se inyectaron células del grupo B Rh+ (**Tabla 31**).

En relación al número de células madre hematopoyéticas utilizadas, en un 62,5% de los casos se inyectaron $2,5 \times 10^5$ células, en un 25% de los mismos se inyectaron 5×10^5 células, y en el 12,5% restante se inyectaron 1×10^5 células. En todos los casos las células se introdujeron diluidas en un tampón salino (PBS), a excepción de uno de los casos, en que se inyectaron $2,5 \times 10^5$ células en el medio de cultivo con los factores de crecimiento hematopoyéticos utilizados para la expansión *ex vivo*. Un 75% de las células madre hematopoyéticas habían sido previamente expandidas *ex vivo*, y en un 50% del total de los casos, las muestras habían sido deplecionadas de la subpoblación celular CD3+ (**Tabla 31**).

Tabla 31. Características de las células madre hematopoyéticas inyectadas en cada animal, ordenadas en función del grupo sanguíneo utilizado.

Animal	Edad (Días)	Características de las células inyectadas			
		Grupo sanguíneo	Nº total de células inyectadas	Células expandidas <i>ex vivo</i>	Depleción de las células CD3+
XCR5	36	B+	$2,5 \times 10^5$	+	-
C1396	44	B+	$2,5 \times 10^5$	+	+
XCR4	39	A+	5×10^5	+	-
024	44	A+	1×10^5	-	-
CR963	37	A+	5×10^5	+	+
S104	38	0+	$2,5 \times 10^5$	-	-
T88009	36	0+	$2,5 \times 10^5$	+	+
PC9502	42	0+	$2,5 \times 10^5$ + M.C + FC	+	+

MC: Medio de Cultivo (RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS); FC: Factores de Crecimiento (25 ng/ml de Stem Cell Factor (SCF), 25 ng/ml de FLT-3 Ligando, 10 ng/ml de Trombopoyetina (TPO), 10 ng/ml de IL-6.)

Se analizaron por citometría de flujo las características fenotípicas de las subpoblaciones de células inyectadas en cada animal. En los casos en los que no se realiza depleción de las células CD3+, se describe el porcentaje de células madre hematopoyéticas (progenitora CD34+), células CD3+, linfocitos T inmaduros, células NK, linfocitos T CD4+ activados, y linfocitos T CD8+ activados (**Figura 60**). En los casos en los que se realizó depleción de las células CD3+, el fenotipo celular se recoge en el apartado 1.1.5 de esta sección de resultados, en las muestras a, c, d y f. (ver **figura 38** del apartado 5.2.2). No pudo realizarse el estudio fenotípico en las células inyectadas en el animal S104, debido a que no se dispuso de un número de células suficientes.

Basados en estos datos, y suponiendo que a los 40 días el embrión tiene una medida de 20 mm, se realizó una estimación de la cantidad de células madre hematopoyéticas trasplantadas, en relación al peso embrionario fetal estimado. Este último, se calculó según los datos de O'Rahilly (113, 202), quien señala que, para embriones humanos de una longitud cráneo-caudal de 50 mm, el peso es de 8 gramos. Aunque se desconoce el peso real para embriones con un LCC de 20 mm, se supone que el rango elegido está en el 50% de peso (0,004 Kg.) (**Tabla 32**)

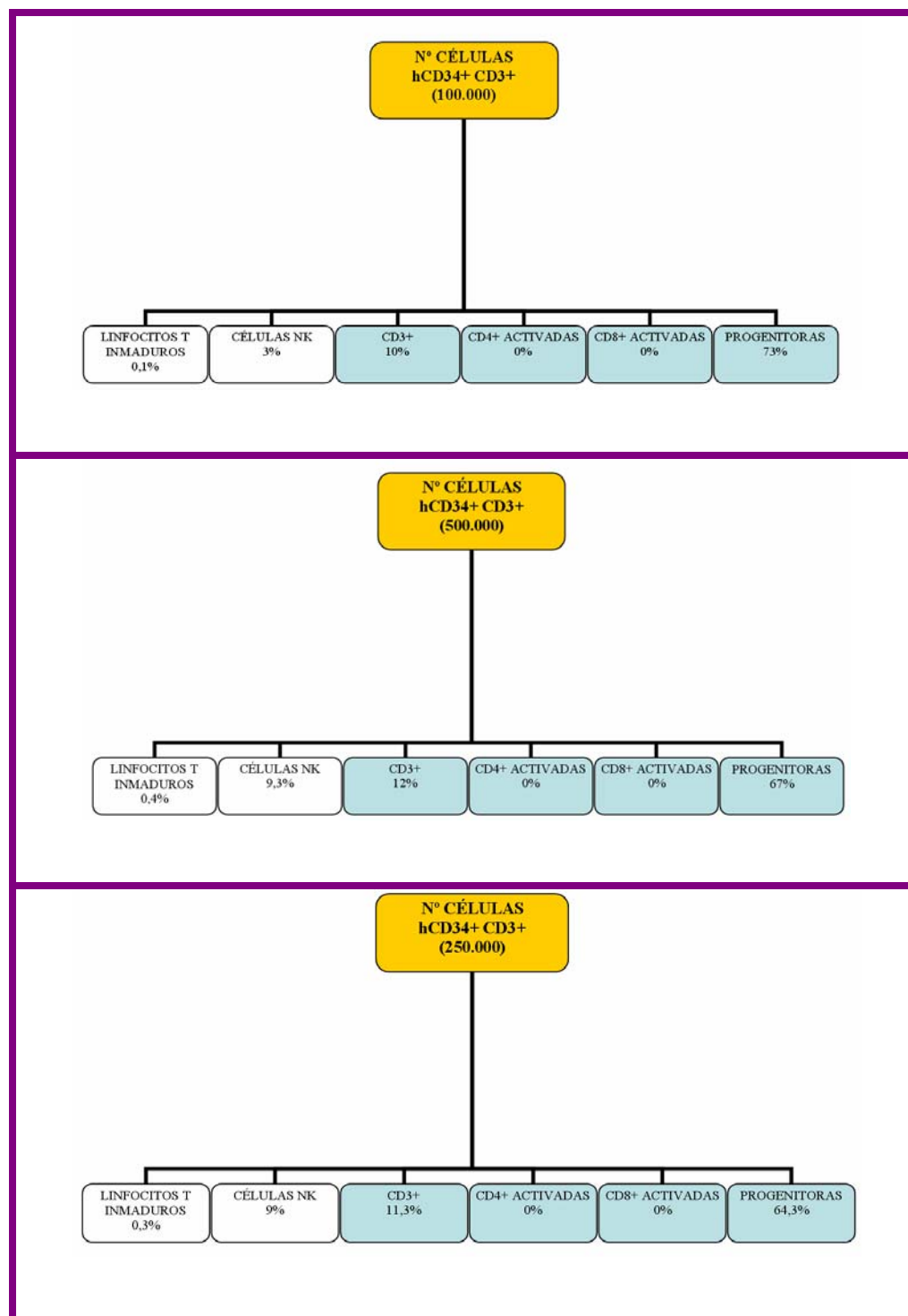
Figura 60. Fenotipo celular de las células inyectadas en 3 de los animales (por orden 024, XCR4 y XCR5).

Tabla 32. Resumen de los datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas vía celocentesis.

Animal	Nº total de células	Edad (días)	Muestra	% células CD34+	Nº total de células CD34+ inyectadas	Nº total de células CD34+ inyectadas/Kg de peso embrionario estimado	% células CD34+	Nº total de células CD3+ inyectadas	Nº total de células CD3+ inyectadas/Kg de peso embrionario estimado	Evolución
XCR5	2,5x10 ⁵	36	(Figura 60)	64,3	1,6 x 10 ⁵	40 x 10 ⁶	11,3	28250	7,1 x 10 ⁶	Aborto
C1396	2,5x10 ⁵	44	c (Figura 38)	68	1,7 x 10 ⁵	43 x 10 ⁶	0,02	50	13000	Gestación en curso
XCR4	5x10 ⁵	39	(Figura 60)	67	3,4 x 10 ⁵	84 x 10 ⁶	12	60000	15 x 10 ⁶	Aborto
024	1x10 ⁵	44	(Figura 60)	73	0,7 x 10 ⁵	18 x 10 ⁶	10	10000	2,5 x 10 ⁶	Nacido
CR963	5x10 ⁵	37	f (Figura 38)	76	3,8 x 10 ⁵	95 x 10 ⁶	0,01	500	120000	Gestación en curso
S104	2,5x10 ⁵	38	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Nacido
T88009	2,5x10 ⁵	36	a (Figura 38)	73	1,8 x 10 ⁵	46 x 10 ⁶	0,01	25	6300	Nacido
PC9502	2,5x10 ⁵	42	d (Figura 38)	71	1,8 x 10 ⁵	44 x 10 ⁶	0,01	25	6300	Gestación en curso
Media	3x10 ⁵	39,5	-	70,3	2,1 x 10 ⁵	53 x 10 ⁶	-	11770	(Mediana) 2,5 x 10 ⁶	-
D.T.	1,3	3,3	-	4	1 x 10 ⁵	26 x 10 ⁶	-	24000	-	-

ND: no determinado; D.T: desviación típica.

5.6.3. Inyección secuencial, durante primer y segundo trimestre, de hCD34+ para determinar tolerancia al xenotrasplante.

En uno de los animales en los que previamente se transfundieron células hCD34+ vía celocentesis transabdominal, se volvieron a trasplantar *in utero*, y procedentes de la misma muestra inyectada a los 36 días postfecundación, $3,5 \times 10^5$ células humanas CD34+ CD3-, a los 111 días postfecundación, a nivel de la porción intrahepática de la vena umbilical por punción ecoguiada. Previamente, se registraron los parámetros biométricos fetales, la frecuencia cardíaca fetal, y se localizó el lugar exacto para realizar la punción. Utilizando la fórmula de Handlock (167) para la estimación del peso neonatal en humanos, se calculó el peso fetal estimado en el babuino y así conocer el número de células/Kg que se inyectan. Inmediatamente después del procedimiento, evaluó de forma exhaustiva el estado de la gestación, la frecuencia cardíaca fetal, así como la superficie hepática y uterina en el lugar de la punción, para descartar cualquier lesión vascular. No se observaron complicaciones maternas-fetales tras el procedimiento. Al cabo de 24 y 72 horas la valoración ecográfica de la gestación fue favorable (**Tabla 33 y 34 y Figura 61**).

Para conocer el estado hematológico del animal, y basados en los resultados obtenidos en el apartado 5.5.1.3 de resultados, se realizaron hemogramas seriados previos, 24 horas después del procedimiento, controlando las variables mediante el intervalo de confianza del 95% para la media de valores en humanos sanos, no encontrándose cambios relevantes en los valores del hemograma de los animales (**Tabla 35**).

Finalmente, se analizaron las características fenotípicas de las células que se inyectaron (ver muestra a y b en la **figura 38** del apartado 5.2.2), así como del número de células por kilogramo de peso fetal estimado (**Tabla 36**).

Tabla 33. Características de las células inyectadas a los 36 y 110 días postfecundación.

		Características de las células inyectadas			
Animal	Edad (Días)	Grupo sanguíneo	Número de células	Células expandidas <i>ex vivo</i>	Depleción de las CD3+
T88009	36	0+	$2,5 \times 10^5$	+	+
T88009	110	0+	$3,5 \times 10^5$	+	+

Tabla 34. Parámetros biométricos tras valoración ecográfica a los 36 y 111 días de gestación.

Animal	36 Días	111 Días							
	LCC	DBP	CC	CA	LF	PFE	FCF según momento del trasplante (lpm)		
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(gr)	Pre	Post	24 horas
T88009	20,3	43	211	180	35	468	139	149	176

LCC: longitud cráneo-caudal; DBP: diámetro bi-parietal; CC: circunferencia cefálica; CA: circunferencia abdominal; LF: longitud femoral; PFE: peso fetal estimado y FCF: frecuencia cardíaca fetal

Figura 61. Ficha Ecográfica a los 111 días postfecundación, momento en el que se inyectan células hCD34+ CD3- en la porción intrahepática de la vena umbilical fetal.

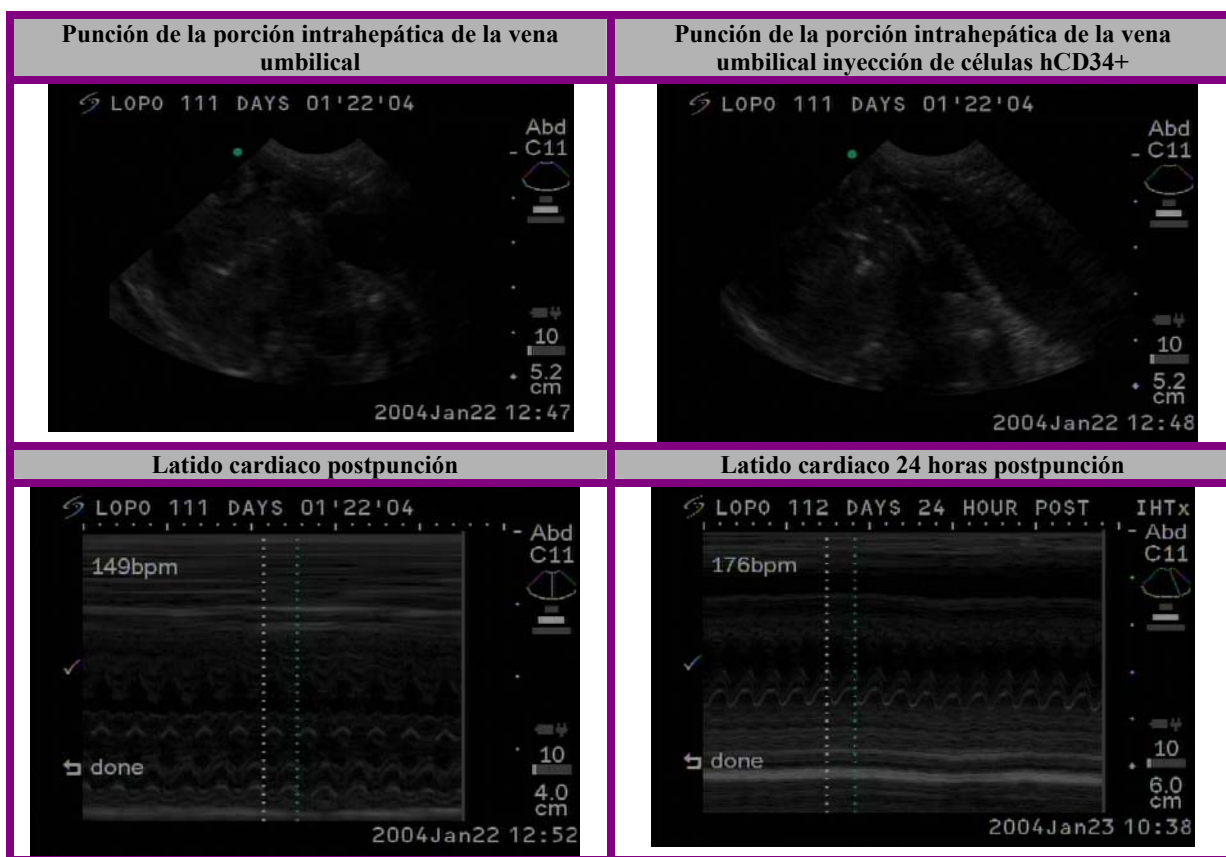


Tabla 35. Resultados de los hemogramas realizados, antes y después del trasplante de células madre hematopoyéticas, a los 110 días después de la fecundación.

Variable	Antes	Después	Unidades	Valores de referencia en humanos (95% I.C.)	
Leucocitos	8,0	9,3	10 ³ /UL	4.8	10.8
Eritrocitos	4,03	4,62	10 ⁶ /UL	4.2	6.1
Hemoglobina	11,3	12,9	g/dL	12	18
Hematocrito	34,7	39,9	%	37	52
Volumen corpuscular medio	86,1	86,5	fL	80	99
Hemoglobina corpuscular media	28,0	27,9	pg	27	31
Plaquetas	273	319	10 ³ /UL	130	400
Volumen plaquetario medio	10,0	9,2	fL	7	11
% neutrófilos	83,5	84,2	%	43	65
% linfocitos	14,1	12,3	%	20.5	45.5
% monocitos	0,6	0,7	%	5.5	11.7
% eosinófilos	1,8	1,7	%	0.9	2.9
% basófilos	0,3	1,1	%	0.3	1
Nº de neutrófilos	6,8	10,2	10 ³ /UL	1.3	7.3
Nº de linfocitos	1,1	1,5	10 ³ /UL	0.4	5.1

Tabla 36. Características fenotípicas de las células injectadas.

Nº total de células	Edad (días)	PFE (Kg)	% células CD34+	Nº total de CD34+ injectadas	Nº CD34+ injectadas /Kg de PFE	% células CD3+	Nº total de CD3+ injectadas	Nº total de CD3+ injectadas/Kg de PFE
2.5 x 10 ⁵	36	0.004	73	1.8 x 10 ⁵	46 x 10 ⁶	0.01	25	6300
3.5 x 10 ⁵	111	0.47	78	2.7 x 10 ⁵	0,6 x 10 ⁶	0.01	35	74

PEF: peso estimado fetal.

5.6.4. Sustitución del líquido extracelómico por medio de cultivo y factores de crecimiento hematopoyéticos para facilitar la expansión *in vivo* de las células madre hematopoyéticas.

En dos animales se extrajeron 1,5 y 3 ml, respectivamente, de líquido extracelómico, mediante celocentesis ecoguiada. Inmediatamente después, se inyectó en el espacio extracelómico, el volumen equivalente extraído, de medio de cultivo con los factores hematopoyéticos utilizados para expandir *ex vivo* las células madre hematopoyéticas (*RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS + factores de crecimiento: 25 ng/ml de Stem Cell Factor (SCF), 25 ng/ml de FLT-3 Ligando, 10 ng/ml de Trombopoyetina (TPO) y 10 ng/ml de IL-6*) (ver apartado 4.3.4.1 de la sección de sujetos a estudio y métodos).

Previamente, se registraron los parámetros biométricos fetales y, tras la celocentesis, se evaluó de forma exhaustiva el estado de la gestación, para descartar cualquier tipo de complicación. En el animal al que se le extrajeron 3 ml de líquido, se observó la formación de

un hematoma subcoriónico de 0,8 x 0,9 mm. No se encontraron complicaciones maternas tras la celocentesis. Nuevamente, a las 24 y 72 horas del procedimiento, se realizó una valoración ecográfica del estado gestacional que, en ambos casos, fue favorable. El hematoma subcoriónico no aumentó de tamaño, ni se observó sangrado vaginal materno.

Tabla 37. Resumen de las características del experimento.

Animal	Edad (días)	Volumen de líquido extracelómico extraído	Características del medio inyectado	Evolución
PC9502	42	1,5 ml	1,5 ml MEDIO + FC + $2,5 \times 10^5$ + hCD34 ⁺ CD3 ⁻	Gestación en curso
6301	38	3 ml	3 ml MEDIO + FC	Gestación en curso

MEDIO: RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS FC: 25 ng/ml de Stem Cell Factor (SCF), 25 ng/ml de FLT-3 Ligando, 10 ng/ml de Trombopoyetina (TPO) y 10 ng/ml de IL-6)

5.6.5. Riesgo de Aborto tras *xenotrasplante in utero*: Importancia del grupo sanguíneo, del número de células hCD34+ trasfundidas y de la depleción de células CD3+

Como consecuencia del aborto de dos de los animales, dentro de las 96 horas siguientes al trasplante de las células hCD34+, y dado a que no se observaron complicaciones maternas, ni signos ecográficos que hicieran sospechar cualquier lesión tras el procedimiento, se valoraron otras posibles causas que podrían haber sido determinantes en la pérdida de la gestación.

1. Carga antigénica del grupo sanguíneo de las células hCD34+ inyectadas.
2. Efecto del número de células hCD34+ inyectadas.
3. Efecto de la expansión *ex vivo* de las células hCD34+, y la posterior depleción de células CD3+, previa a la inyección.
4. Influencia de los linfocitos T y células NK (porcentaje del fenotipo celular) en las células hCD34+ inyectadas.

5.6.5.1. Importancia de la carga antigénica del grupo sanguíneo de las hCD34+ inyectadas en el riesgo de aborto.

A pesar de la ventaja de haber introducido células de grupo sanguíneo distinto para poder detectarlas posteriormente en caso de que se lograra el injerto, la introducción de células con carga antigénica diferente, pudo ser determinante en el posible rechazo entre las

células del donante y del receptor. En la **tabla 38** se describe el grupo sanguíneo de cada una de las muestras empleadas por cada animal, y la evolución final de la gestación. El análisis de los resultados puso de manifiesto que no existió relación entre los abortos y el grupo sanguíneo de las células introducidas; ya que muestras del mismo grupo sanguíneo (ARh+ y BRh+) fueron introducidas en otros animales, y los embarazos fueron viables.

Tabla 38. Datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas en función del grupo sanguíneo.

Animal	Edad (días)	Grupo sanguíneo	Evolución
XCR5	36	B+	Aborto
C1396	44	B+	En curso
XCR4	39	A+	Aborto
024	44	A+	Nacido
CR963	37	A+	En curso
S104	38	0+	Nacido
T88009	36	0+	Nacido
PC9502	42	0+	En curso

5.6.5.2. Importancia del número de células hCD34+ inyectadas en el riesgo de aborto

En la **tabla 39** se describe el número de células hCD34+ introducidas en cada animal. El análisis de los resultados puso de manifiesto que no existe relación entre los abortos y el número de células introducidas; dosis similares ($2,5 \times 10^5$ y 5×10^5) de células hCD34+ fueron introducidas en otros animales y los embarazos fueron viables.

Tabla 39. Datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas en función del grupo sanguíneo y el número de células inyectadas.

Animal	Edad (días)	Grupo sanguíneo	Nº total de células hCD34+ inyectadas ($N \times 10^5$)	Evolución
XCR5	36	B+	2,5	Aborto
C1396	44	B+	2,5	En curso
XCR4	39	A+	5	Aborto
024	44	A+	1	Nacido
CR963	37	A+	5	En curso
S104	38	0+	2,5	Nacido
T88009	36	0+	2,5	Nacido
PC9502	42	0+	2,5	En curso

5.6.5.3. Importancia de la expansión *ex vivo* de las células hCD34⁺ y la depleción de células CD3⁺ previo a la inyección de células en el riesgo de aborto

Como se ha demostrado en la **tabla 16** del apartado 5.2.1 de esta sección de resultados, las células hCD34⁺ expandidas *ex vivo*, incrementan su número en cerca de 10 órdenes de magnitud al cabo de 14 días de cultivo, hecho que se acompaña de la pérdida de la expresión del antígeno CD34 en el 78 % de las células. Se encontró además, que a pesar de estos resultados, tras una nueva selección de las células que expresan CD34⁺, por MACS, al cabo de 21 días de incubación, se obtenían finalmente, cerca de 5 órdenes de magnitud superiores, respecto al número de células hCD34⁺ con las que se iniciaban el cultivo.

El marcador o antígeno de superficie CD3, es un marcador característico de células linfoides (linfocitos T, en su mayoría, células NK, células del sistema monocito-macrófago). La presencia de estas células, en el *pool* de células trasplantadas, se ha relacionado con incremento del rechazo entre el donante y el receptor (203, 204). Para controlar este factor, se deplecionó la subpoblación de células CD3⁺ de las alícuotas de células hCD34⁺ que fueron inyectadas.

En la **tabla 40** se describen las características de las células trasplantadas, en relación a la expansión *ex vivo* de la muestra, y la presencia de células CD3⁺. El análisis de los resultados, puso de manifiesto que la expansión, sin depleción de las células CD3⁺, fue el criterio común entre los casos de abortos. Para conocer el fenotipo de las células inyectadas en cada muestra, se analizó el porcentaje de células CD34⁺ y CD3⁺ por citometría de flujo. A pesar del reducido número de casos, para determinar diferencias significativas, se observó que, en aquellas gestaciones en las que se produjo el aborto, existía un porcentaje bajo en células CD34⁺ junto a un elevado porcentaje de CD3⁺ (**Tabla 41**)

Tabla 40. Datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas en función del grupo sanguíneo, el número de células inyectadas, haber expandido *ex vivo* las hCD34+ y/o deplecionado las células CD3+.

Animal	Edad (días)	Grupo sanguíneo	N° total de células hCD34+ inyectadas (N x 10 ⁵)	Expansión <i>ex vivo</i> (+/-) Depleción CD3+	Evolución
XCR5	36	B+	2,5	(+) No deplecionadas	Aborto
C1396	44	B+	2,5	(+) Deplecionadas	En curso
XCR4	39	A+	5	(+) No deplecionadas	Aborto
024	44	A+	1	(-) No deplecionadas	Nacido
CR963	37	A+	5	(+) Deplecionadas	En curso
S104	38	0+	2,5	(-) No deplecionadas	Nacido
T88009	36	0+	2,5	(+) Deplecionadas	Nacido
PC9502	42	0+	2,5	(+) Deplecionadas	En curso

Tabla 41. Datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas en función del número de células inyectadas y el porcentaje de células CD34+ y CD3+

Animal	Edad (días)	N° total de células y fenotipo celular	% células CD34+	% células CD3+	Evolución
XCR5	36	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	64,3	11,3	Aborto
C1396	44	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	68	0,02	En curso
XCR4	39	5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	67	12	Aborto
024	44	1 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	73	10	Nacido
CR963	37	5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	73	0,03	En curso
S104	38	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	ND	ND	Nacido
T88009	36	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	56	0,01	Nacido
PC9502	42	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	71	0,001	En curso

hCD34+CD3+: Células CD34+ No Deplecionadas de células CD3+; hCD34+CD3-: Células CD34+ Deplecionadas de células CD3+; ND: No determinado

5.6.5.4. Importancia de las subpoblaciones de células linfocitos T y NK en el riesgo de aborto.

Al igual que en el apartado anterior, se registró el porcentaje de las fracciones celulares que expresaban CD3, en particular los linfocitos T y las células NK de estirpe linfocítica, introducidas en cada animal. Dentro del conjunto de linfocitos T, se analizaron los

linfocitos T inmaduros (CD2+), los linfocitos T CD4+ activados y linfocitos T CD8+ activados (ver **tabla 8** del apartado 4.3.5). En la **tabla 42** se describe el porcentaje de cada uno de los subgrupos celulares CD3+, y la evolución de la gestación tras el trasplante. Un porcentaje elevado de NK fue el factor común en aquellos casos de aborto.

Tabla 42. Datos referidos a cada uno de los animales a los que se trasplantaron células madre hematopoyéticas en función del número de células inyectadas y el porcentaje de las subpoblaciones CD3+

Animal	Edad (días)	Nº total de células y fenotipo celular	Subpoblación celular CD3 ⁺				Evolución
			% Células CD4 ⁺	% Células CD8 ⁺	% Células T inmaduras	% % Células NK	
XCR5	36	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	0	0	0,3	9	Aborto
C1396	44	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	0	0	0	0	En curso
XCR4	39	5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	0	0	0,4	9,3	Aborto
024	44	1 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	0	0	0,1	3	Nacido
CR963	37	5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	0	0	0	0	En curso
S104	38	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3+	ND	ND	ND	ND	Nacido
T88009	36	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	0	0	0	0	Nacido
PC9502	42	2,5 x 10 ⁵ hCD34+CD3-	0	0	0	0	En curso

hCD34+CD3⁺: Células CD34+ No Deplecionadas de células CD3⁺; hCD34+CD3⁻: Células CD34+

Deplecionadas de células CD3⁺; ND: No determinado

5.7. Estudios neonatales y técnicas para la detección de quimerismo humano-babuino, en los animales sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas hCD34+

5.7.1. Resumen de las características clínicas perinatales.

Se analizan los resultados obtenidos en tres recién nacidos babuinos a los que se les había trasplantado *in utero* células hCD34+, vía celocentesis ecoguiada, alrededor de los 40 días postfecundación. Basados en los normogramas de edad gestacional y peso neonatal para recién nacidos babuinos a término y sin complicaciones perinatales (ver **tabla 25** y **figura 53** del apartado 5.5.1.4 de los resultados), se calcularon los percentiles de ambas variables para los tres neonatos. A pesar de que dos de ellos fueron asistidos mediante cesárea, en relación a la edad gestacional y el peso neonatal, todos los recién nacidos se situaban dentro del intervalo de confianza del 95% para la media de cada variable calculada en la población control (**Tabla 43**).

Tabla 43. Resultados perinatales obtenidos de tres recién nacidos sometidos a trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas.

Animal	Vía del parto	Sexo neonatal	Edad gestacional (días postfecundación)	Percentil de edad gestacional	Peso neonatal (gramos)	Percentil de peso neonatal
Recien nacido 1	Cesárea	Hembra	175	p39	890	p35
Recien nacidos 2	Parto vaginal	Varón	181	p58	970	p78
Recien nacido 3	Cesárea	Hembra	182	p78	1.020	p92

5.7.2. Determinación del grupo sanguíneo mediante el test de aglutinación.

El test de aglutinación permitió confirmar, en un total de 45 animales, de distinto sexo y edad, que el grupo sanguíneo fue siempre 0 Rh-. De esta forma, ante la posibilidad de lograr el injerto de células humanas de grupo sanguíneo distinto al del babuino, se podría realizar el diagnóstico de *xenoquimerismo*, mediante esta técnica.

5.7.2.1. Determinación de la sensibilidad del test de aglutinación

Con el fin de determinar la sensibilidad del test de aglutinación para detectar el factor Rh, en el caso de que se estableciera una *xenoquimera*, se tomó sangre de los grupos sanguíneos 0 Rh- (animal) y 0 Rh+ (humano), y se realizaron diluciones seriadas (sangre factor Rh+ : sangre factor Rh-): 1:0; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100; 0:1. En función de los resultados obtenidos, se deduce que en los casos de formación de *xenoquimeras*, en las que las células humanas Rh+ representen un porcentaje igual o superior al 5%, el factor Rh+ puede ser detectable mediante el test de aglutinación (**Tabla 44**).

Tabla 44. Resultados de la sensibilidad del test de aglutinación. Se remarcan las diluciones en las que se no se detecta el factor Rh.

Relación Rh ⁺ /Rh ⁻	1:0	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	0:1
Factor Rh resultante	Rh ⁺	Rh ⁺	Rh ⁺	Rh ⁺	Rh ⁺	Rh ⁺	Rh ⁻	Rh ⁻	Rh ⁻

Todas la células madre hematopoyéticas humanas trasplantadas fueron Rh+. En los tres neonatos a los que se les trasplantaron *in utero* células hCD34+, el grupo sanguíneo resultante fue 0 Rh-, lo que indica que en el caso de que se haya establecido *xenoquimerismo* este sería inferior al 5%.

5.7.2.2. Estudios citogenéticos

Los estudios citogenéticos realizados en 9 animales no trasplantados, de distinta edad y sexo, dieron un cariotipo resultante de 42 cromosomas (20 pares de cromosomas autosómicos más un par de cromosomas sexuales). A diferencia del babuino, el cariotipo que caracteriza a las células humanas está compuesto 46 cromosomas (22 pares más un par de cromosomas sexuales), resultados útiles para el diagnóstico de *xenoquimerismo* en el caso de esta se estableciera.

En ninguno de los tres neonatos en los que se trasplantaron *in utero* células hCD34+ se identificaron la presencia de células con 46 cromosomas. Dado que la sensibilidad del cariotipo detecta hasta 1 en 200 células, en el caso de que se hubiera establecido *xenoquimerismo*, éste sería inferior al 0,5%.

5.7.2.3. Técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia

En 32 animales analizados, que no fueron trasplantados con células hCD34+, las sondas para FISH de los cromosomas X e Y humanos, no hibridaron con los cromosomas X e Y de los babuinos. Por el contrario, se encontró que dichas sondas hibridaban de forma específica en los controles humanos correspondientes.

En los tres neonatos en los que se realizó el trasplante *in utero* de hCD34+, las sondas utilizadas no hibridaron con los cromosomas X e Y presentes en el babuino. Dado que la sensibilidad de la técnica es cercana al 1%, los datos indican que en el caso de que se hubiera establecido *xenoquimerismo*, éste sería inferior a dicho porcentaje.

5.7.2.4. Citometría de flujo.

Siguiendo el mismo proceso que en las muestras de sangre del cordón umbilical humano (apartado 5.1.1 de esta misma sección), se aislaron las células mononucleares de sangre periférica, de 3 animales (unicamente uno de ellos había sido sometido a trasplante de células hCD34+). Estas células se incubaron con las combinaciones de anticuerpos monoclonales correspondientes (apartado 4.3.5 de sujetos de estudio y métodos). En todos los casos se analizaron un mínimo de 5.000 células.

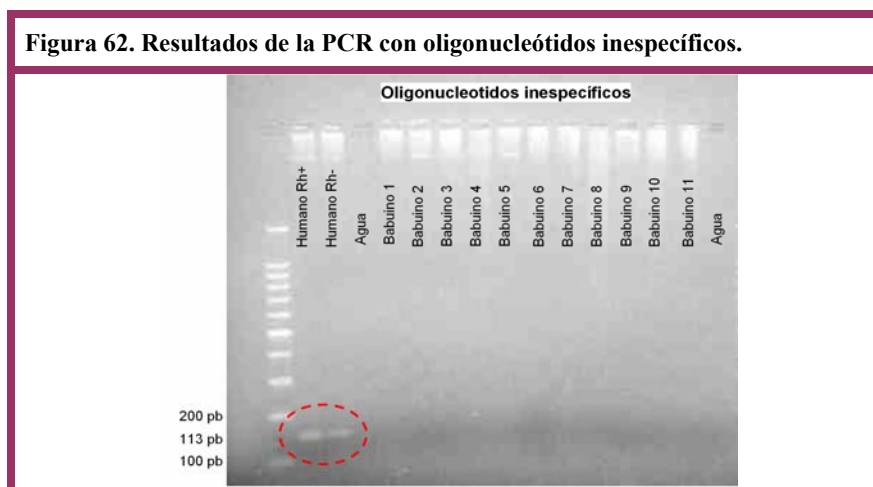
En este punto se detectó un problema de reactividad cruzada humano-babuino, con los anticuerpos monoclonales del panel de citometría (ver **tabla 8** en el apartado 4.3.5 de sujetos de estudio y métodos). Inicialmente, la casa comercial indicó los anticuerpos que presentaban especificidad humana, los que presentaban reactividad cruzada entre humanos y babuinos, y un tercer grupo del que no se tenía información acerca de la especificidad de especie. Basado en ésta información, se escogieron las combinaciones de anticuerpos monoclonales de especificidad conocida, para diagnosticar células humanas en las células del babuino. Sin embargo, esto no fue posible porque todos los anticuerpos monoclonales mostraron ser inespecíficos para las células de babuinos y humanos, por lo que los datos presentados en esta Memoria indican que dichos anticuerpos monoclonales, no son útiles para la detección de *xenoquimerismo* humano-babuino.

5.7.2.5. Estudios moleculares utilizando el genotipo Rh del grupo sanguíneo

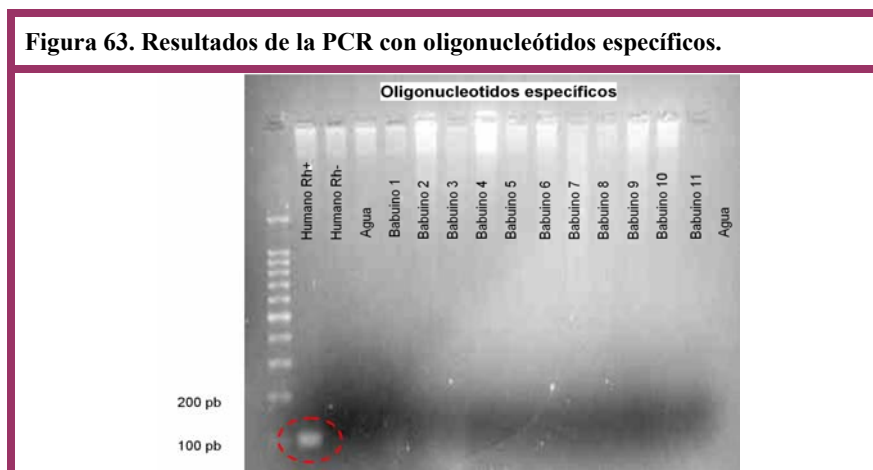
A partir de las células mononucleares de sangre periférica de 11 animales no trasplantados, de distinta edad y sexo, y dos controles humanos, con diferente factor Rh, se

aisló el DNA, y se realizaron experimentos de PCR (ver anexos: protocolo de extracción del DNA)

Cuando se emplearon oligonucleótidos inespecíficos o degenerados, sólo se detectaron las bandas correspondientes a los controles de sangre humana, dos bandas de 113 pares de bases (pb) en las células humanas Rh+ y Rh- (**Figura 62**).



Cuando se emplearon oligonucleótidos específicos para Rh+, sólo la muestra de DNA procedente de sangre humana con Rh+ amplificó, originando una única banda de, aproximadamente, 99 pb (**Figura 63**).



Basado en estos resultados, el estudio de molecular del genotipo del grupo Rh puede ser útil para el diagnóstico de *xenoquimerismo*.

En los 3 neonatos babuinos a los que se trasplantaron *in utero* células hCD34+, sólo se obtuvieron productos amplificados de la sangre humana Rh+ y Rh-, empleadas como control. No pudiéndose detectar *xenoquimerismo* por esta técnica.

5.7.2.6. Determinación de la sensibilidad de la anidada PCR o *nested* PCR

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la PCR, se puso a punto la técnica de anidada PCR o *nested* PCR, como método de detección de *xenoquimerismo*, utilizando los oligonucleótidos del apartado anterior. Para determinar su sensibilidad se tomaron muestras de sangre total de dos animales no trasplantados, y se realizaron seis diluciones con células CD34+ de cordón umbilical de recién nacidos humanos (hCD34+) de grupo sanguíneo 0 Rh+.

Las diluciones se hicieron en función a los valores de células blancas/ml en sangre que presentaban los animales, determinados por un hemograma: el animal B1 tuvo $11,4 \times 10^6$ células blancas/ml y el animal B2 tuvo $11,3 \times 10^6$ células blancas/ml. Se realizaron diluciones seriadas desde una relación 1:10 hasta $1:10^6$ (células blancas babuino/células hCD34+). Una vez realizadas las diluciones, se aisló el DNA.

Se realizó entonces una primera PCR empleando los oligonucleótidos inespecíficos o degenerados y sobre el material amplificado se realizó una segunda PCR con los oligonucleótidos específicos. Se encontró una banda que se correspondía con un fragmento de 99 pb en todas las diluciones, producto de la amplificación de la secuencia Rh+ humana, además de las bandas correspondientes a los controles de sangre humana Rh+ y Rh-. Estos datos indican que con la anidada PCR se puede detectar al menos una célula humana hCD34+ en un millón de células babuinas (**Tabla 45** y **Figura 64**).

Cuando se trató de extrapolar a los animales neonatos trasplantados *in utero* con células hCD34+, en el primer animal estudiado se encontró una amplificación inespecífica y se descartó inicialmente esta técnica para analizar los siguientes animales, hasta que se realizaran más estudios y se pudiese determinar los diversos factores que justifiquen la inespecificidad encontrada.

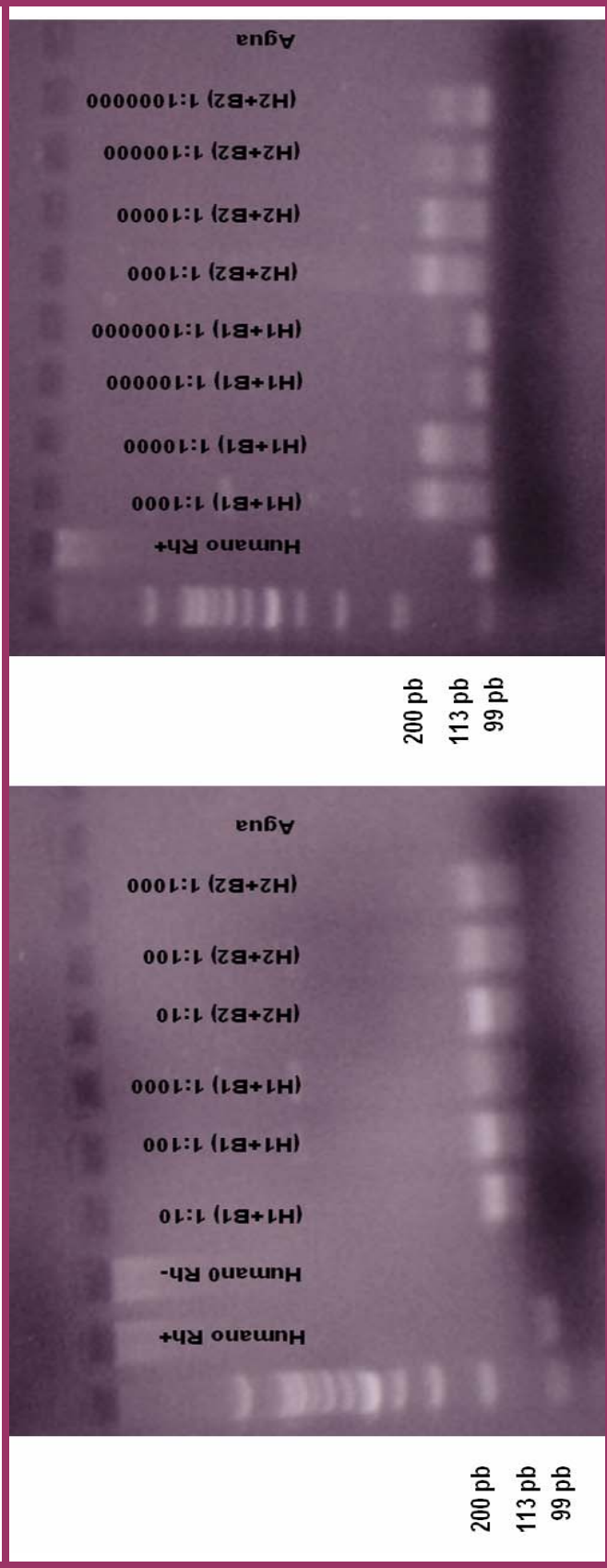
Otra vía que queda por explorar es el diseño de nuevos pares de oligonucleótidos específicos para la región humana Rh+, tratando de realizar la doble PCR con los nuevos oligonucleótidos.

Tabla 45. Determinación de la sensibilidad de la anidada o nested PCR.

Dilución de las hCD34+en sangre de babuino.	hD34+ (Rh+) H1	(Rh-) B1	hD34+ (Rh+) H2	(Rh-) B2	Oligonucleótidos inespecíficos 113 pares de bases				PCR Anidada 99 pares de bases			
					H1	B1	H2	B2	H1	B1	H2	B2
PCR CONTROL	+	-	+	-								
ESTUDIO	1		2		H1+B1		H2+B2		H1+B1		H2+B2	
1:10	$1.14 \times 10^6 + 11.4 \times 10^6$		$1.13 \times 10^6 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+
1:100	$1.14 \times 10^5 + 11.4 \times 10^6$		$1.13 \times 10^5 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+
1:1000	$1.14 \times 10^4 + 11.4 \times 10^6$		$1.13 \times 10^4 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+
1:10000	$1.14 \times 10^3 + 11.4 \times 10^6$		$1.13 \times 10^3 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+
1:100000	$1.14 \times 10^2 + 11.4 \times 10^6$		$1.13 \times 10^2 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+
1:1000000	$11.4 + 11.4 \times 10^6$		$11.3 + 11.3 \times 10^6$		-	-	-	-	+	+	+	+

CD34+: células CD34+ procedente de la sangre de cordón umbilical de humanos; H: humano; B: babuino.

Figura 64. Resultado de la PCR anidada en las diluciones de células hCD34+ en sangre de babuinos



H: humano; B: babuino; pb: pares de bases.

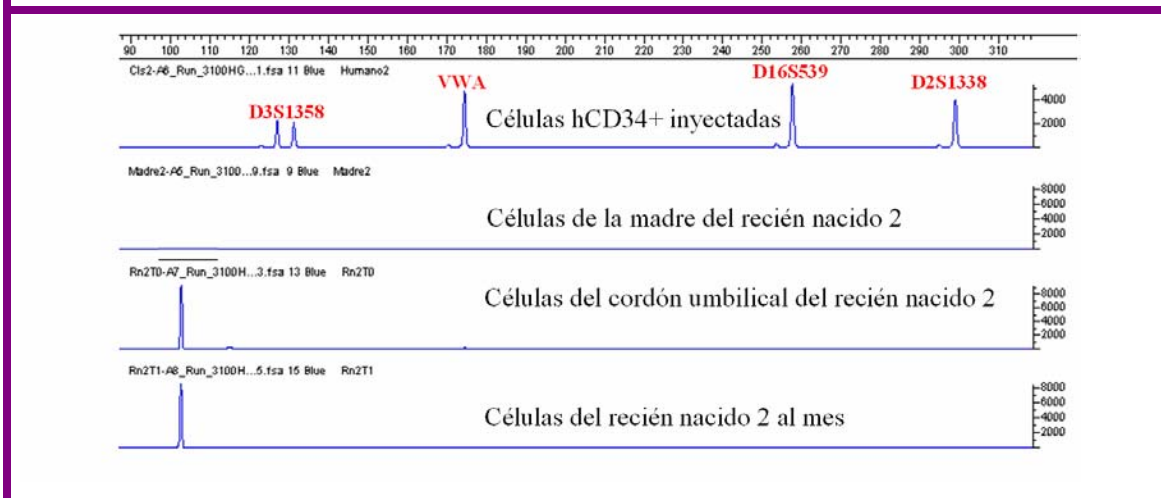
5.7.2.7. Estudios moleculares utilizando secuencias *Short Tandem Repeat* PCR múltiple.

Con el mismo objetivo se realizó la determinación de las secuencias *short tandem repeat* (STR) por PCR múltiple para detectar *xenoquimerismo* en dos de los neonatos babuinos que habían sido trasplantados *in utero* con células hCD34+.

En la figura 64 se representan los resultados obtenidos en dos neonatos a los que se les había trasplantado células hCD34+. Para caracterizar el patrón de los alelos STR presentes en los recién nacidos, se utilizó el ADN de las células hCD34+ inyectadas, dependiendo de cada animal y de la madre de cada uno de los neonatos.

No se detectó la presencia de un patrón STR característico de las células hCD34+ en las muestras obtenidas de los neonatos. En base a estos resultados, es de esperar que en el caso de que se haya establecido *xenoquimerismo*, este sería inferior al 0,1% de la celularidad total del recién nacido babuino.

Figura 65 Resultados del análisis de fragmentos en la electroforésis capilar tras PCR para detectar STR para los marcadores D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338 marcados con 5-FAM (azul).



6. DISCUSIÓN

El trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas en estadios precoces del desarrollo embrionario, intenta conseguir que las células de un donante, establezcan una quimera hematopoyética en el receptor, que sea tolerada y que pueda expandirse a largo plazo. Dicha tolerancia inmunológica se alcanzaría tras 1) el trasplante de células hematopoyéticas en un periodo de desarrollo embrionario previo a la presencia de un timo funcional, evitando así, la competencia inmunológica de las células T; 2) provocar una tolerancia central por selecciones clonales en las células epiteliales del timo con receptores para los linfocitos T y, por tanto, con alta afinidad para los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y 3) provocar una tolerancia periférica mediante la supresión de los linfocitos T citotóxicos maduros (CD8+) frente a las moléculas HLA de clase I.

En esta Memoria, se han estudiado los diferentes pasos para realizar y controlar el trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas CD34+, procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos sanos, a embriones preinmunes babuinos, a través de la celocentesis ecoguiada. En gestaciones humanas y en primates, el periodo de tolerancia inmunológica es anterior a las 14 semanas postfecundación. Con intención de tratar una enfermedad diagnosticada en el embrión, se ha demostrado, que mediante la celocentesis se puede realizar el diagnóstico citogenético prenatal, así como el trasplante de células madre hematopoyéticas al entorno embrionario durante el periodo preinmune.

En la actualidad, la expresión del antígeno CD34 es considerada un indicador de célula hematopoyética primitiva (22). Estas células han demostrado clínicamente, una elevada capacidad de repoblar la médula ósea, tras el trasplante celular, tanto en niños, como en adultos (30). Dada su facilidad de recolección, transporte y almacenaje, la mayor disponibilidad de las células madre hematopoyéticas, así como por su inocuidad y asepsia, la sangre del cordón umbilical del recién nacido, se convierte en la fuente de obtención de células madre hematopoyéticas CD34+ que presenta mayor expansión en los últimos años (33).

Desde que Broxmeyer en 1988, utilizó por primera vez la sangre de cordón umbilical, en un niño afecta de anemia de Fanconi, utilizando sangre de su hermana, hasta hoy, se han realizado más de 4.000 trasplantes de células madre hematopoyéticas procedentes de la sangre

del cordón umbilical (78, 205). Esto ha motivado que, a nivel mundial, se estén creando bancos de sangre de cordón, para más de 100.000 donaciones, tanto públicos como privados. Estos últimos, motivando a sus clientes a conseguir un futuro “seguro biológico” para toda la familia.

La evidencia de que las células CD34+ del cordón umbilical podían reconstituir la hematopoyesis procede de los resultados obtenidos tras experimentos con diluciones límite de células CD34+, que pusieron de manifiesto que el porcentaje de células que proliferan depende de las fuentes de progenitores, y que la mayor proliferación y capacidad de integración a largo plazo, proviene de células CD34+ del cordón umbilical, cuando se compara con los resultados tras utilizar médula ósea o sangre periférica (80-82, 206-210).

La eficacia del trasplante utilizando sangre del cordón umbilical, se correlaciona con el número total de células nucleadas o con el número total de células madre hematopoyéticas CD34+ (30, 33). El menor tiempo en lograr el injerto, y la mejor supervivencia, tras el trasplante, se han conseguido tras administrar una dosis superior a de 2×10^8 células nucleadas por Kg de peso o 2×10^6 células CD34+ por Kg de peso (30). Se observó, que tras la recogida de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos a término y sanos, el número de células CD34+ aisladas por una técnica de separación inmunomagnética (MACS), se correlaciona de forma directamente proporcional con el volumen de sangre recogido (**Figura 35**). Además, se encontró que el número de células CD34+ por ml de sangre recogida es independiente de la edad materna, grupo étnico, edad gestacional, peso neonatal, grupo sanguíneo neonatal, sexo neonatal, vía del parto, así como, del valor del test de Apgar al 1º y 5º minuto. Por el contrario, el número de células CD34+, por ml de sangre recogida, tras MACS, se relaciona de forma directa con el peso placentario (**Figura 35**).

La mayoría de los estudios que analizan la influencia de los factores obstétrico-perinatales en las características de la sangre del cordón umbilical, se basan fundamentalmente en conocer los cambios en el volumen de sangre recogido, el número total de células mononucleares y el porcentaje de progenitores hematopoyéticos o unidades formadoras de colonias hematopoyéticas, todas ellas relacionadas entre sí (59-61). Jones et al (211) observaron en 9.205 partos, que el volumen de sangre recogido depende, de forma directamente proporcional, del porcentaje de cesáreas, del periodo de dilatación, la distancia

en cm desde la inserción del cordón umbilical en la placenta y el lugar de la punción, el peso neonatal y el peso placentario, siendo este último el factor de mayor relevancia tras el análisis multivariante ($p < 0,001$), en concordancia con otros autores (212-214). Tras la aparición de la técnica de la citometría de flujo, comienza a describirse la relación entre las variables obstétrico-perinatales y el número de células CD34+ (68, 69, 215). Dicho número se relaciona de forma inversamente proporcional con la edad gestacional, siendo más llamativo, el descenso del número de células CD34+ en las gestaciones por encima de las 28 semanas de gestación (78, 215). En estos trabajos, además, no se observa relación entre el número de CD34+ y la vía del parto, el periodo de dilatación o el sexo neonatal. Por el contrario, se sigue observando una relación directamente proporcional entre el número de CD34+, el peso neonatal y el peso placentario (33). Aunque la separación de las células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical, mediante métodos inmunomagnéticos, resulte ideal, no se encuentran trabajos en la literatura que hablen sobre la influencia de los factores obstétrico-perinatales y el número total de células CD34+ separadas por MACS, por ml de sangre recogido y que, basados en los resultados de esta Memoria, el peso placentario supone el factor más importante, dentro de los parámetros estudiados (**Figura 35**).

Una de las mayores limitaciones del uso de la sangre del cordón umbilical es el reducido volumen que se obtiene por recién nacido. Habitualmente, la media de volumen obtenido de sangre de cordón umbilical es de 70 ml (30, 33). En los resultados de esta Memoria, la media \pm D.T. y el rango (min,max) de volumen fue de $38,4 \pm 6$ (30; 63) ml, cerca del 55% de lo habitual, si bien es cierto que, se encontraron valores cercanos al mínimo al inicio del estudio, y dada la curva de aprendizaje del personal responsable de la extracción, el porcentaje de volúmenes elevados al final del estudio fue mayor.

A diferencia de la sangre del cordón umbilical, la media de volumen de sangre procesada, cuando se utiliza la sangre periférica como fuente de células madre hematopoyéticas, es cercana a 15 litros, por lo que es patente, que el potencial de la sangre del cordón umbilical como fuente de células CD34+ es casi 100 veces menor que el de la sangre periférica (216). Una de las alternativas para suplir este déficit potencial, se basa en la posibilidad de expandir *ex vivo* las células madre hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical. En general, existen múltiples alternativas de reproducir *in vitro* la hematopoyesis y analizar la capacidad de expansión *ex vivo* utilizando medio de cultivo con suero y citocinas,

suplementado o no con cytomatrix, fue una de las bases experimentales de este estudio. Se encontró que tras incubar las células CD34⁺ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos, durante 7 y 14 días, la tasa de proliferación celular fue de 2 y 10 veces, respectivamente, con un porcentaje de pérdida en la expresión de CD34 del 78% al cabo de 14 días de incubación, sin que pudieran demostrarse diferencias entre las distintas condiciones de cultivo, dado el escaso número de muestras analizadas (**Tabla 16 y Figura 37**). No se han encontrado en la literatura trabajos que reproduzcan de forma fidedigna, la metodología de éste estudio. Las distintas combinaciones, de suero y citocinas, han sido descritas de forma separada en varios estudios de expansión *ex vivo* de múltiples fuentes, incluyendo la sangre de cordón umbilical. Zandstra et al (217) con células CD34⁺ procedentes de la médula ósea, utilizando IL-3, SCF, y FLT-3L, alcanza, al cabo de 14 días, un incremento en el número de células de 45 veces. Petzer et al (218) con células madre hematopoyéticas procedentes de sangre periférica, utilizando IL-3, SCF, FLT-3L y factor de crecimiento granulocítico, alcanza, al cabo de 7 días de incubación, un incremento en el número de células de 2-5 veces. Piacibello et al (219) con células CD34⁺ procedentes de la sangre del cordón umbilical, utilizando FLT-3L y TPO, alcanza, al cabo de 14 días, un incremento en el número de células de 150 veces. Inicialmente, Bagley et al (220) y, posteriormente, Banu et al (221), describen la utilización de biomatrices tridimensionales para la expansión de células CD34⁺ procedentes de médula ósea humana. Estos autores observaron una mayor capacidad de proliferación y un menor porcentaje de pérdida de la expresión de CD34⁺ en aquellas placas de cultivo con medio y citocinas que se suplementaban con cytomatrix frente a aquellas que no tenían cytomatrix, al cabo de 3 y 6 semanas de incubación. Además, Banu et al demostraron que el porcentaje de pérdida en la expresión de CD34⁺ es inversamente proporcional a la concentración de citocinas, particularmente IL-3, cuando se estudian órdenes de nanogramos y picogramos de concentración. Al cabo de 21 días de incubación y, tras nueva separación de las células CD34⁺, se obtuvo un incremento de 5 veces el número inicial de células CD34⁺; nuevamente, este dato no pudo contrastarse con la literatura, pero es obvio que encontrar un sistema de expansión *ex vivo* que promueva la proliferación celular, acompañado de una mínima diferenciación o pérdida de la potencialidad de las células madre, es el objetivo primordial de este campo de la hematología.

Hoy en día, pueden encontrarse diferentes medios comerciales capaces de mantener las células progenitoras en cultivos de expansión continua durante meses (Stempro34 de Life

Technologies, X-VIVO de Bio-Whitaker, Cellgro de Cellgenix y otros), aunque son sistemas que se encuentran en constante evolución y cuya aplicación no esta estandarizada.

En cuanto al uso potencial de las células madre hematopoyéticas previamente expandidas, los resultados obtenidos en animales de experimentación resultan contradictorios. En 1992, Muench et al (222) obtuvieron resultados favorables en cuanto al porcentaje de injerto cuando, las células madre hematopoyéticas procedentes de médula ósea y posteriormente trasplantadas en ratones, eran previamente expandidas *ex vivo* con IL-1 y SCF, frente a las células no expandidas. Ratajczak et al (223) al incubar las células con IL-1, SCF, TPO e IL-3 observaron que se aceleraba la recuperación medular, en relación al número de plaquetas y neutrófilos, cerca de una semana, lo que se relaciona con un mayor porcentaje de supervivencia, al compararlo con los resultados tras trasplantar células de médula ósea fresca. Además, el inóculo previamente expandido representaba una décima parte de los inóculos no expandidos.

Uno de los potenciales de la expansión *ex vivo*, con intención de posteriormente inyectar las células, es la excesiva diferenciación, con pérdida de la capacidad de autorenovación, e inducción de las células hacia líneas celulares específicas y pérdida de la multipotencialidad. Hirayama y Ogawa (224) en ratones, demuestran que el tratamiento previo de las células con IL-1 e IL-3 inhibe la expansión de la línea linfocítica B en el receptor (53). Bathia et al (225) tras añadir IL-1, SCF TPO e IL-3 encuentra una disminución del porcentaje de injerto y la capacidad de repoblación celular a largo plazo en ratones. De igual forma en primates, Brant et al (226) tras expandir células CD34+ procedentes de la médula ósea alogénica, con IL-1, IL-6 y SCF observan *in vitro* un incremento en la población celular, en el número de CD34+, así como, de progenitores hematopoyéticos del tipo célula formadora de colonias granulocíticas y contradictoriamente un retraso en la recuperación hematopoyética de los animales trasplantados con éstas células frente a los que habían sido trasplantados con médula ósea fresca. Por el contrario, Andrews et al (227) tras expandir previamente las células trasplantadas con SCF y G-CSF consigue una disminución de dos semanas en la recuperación neutrófila, sin que se observaran cambios en la recuperación plaquetaria. Para objetivar los efectos beneficiosos de la expansión, fue necesaria la inyección, post trasplante, de factores de crecimiento hematopoyético en los animales. Los resultados obtenidos en estudios animales tras inyectar células madre hematopoyéticas

humanas previamente expandidas, son igualmente contradictorios y se desconoce el efecto que el propio *xenotrasplante* puede tener sobre este particular. Muchas de estas diferencias podrían explicarse por la amplia diversidad en la metodología utilizada, en que, a pesar de conocer el número y el fenotipo celular, se desconoce el porcentaje de células que se encuentran en una u otra fase del ciclo celular, la utilidad de uno u otro factor de crecimiento en relación a la concentración necesaria para la expansión y, por tanto, quedan muchos interrogantes por responder en este campo.

No existen estudios animales o humanos, que hagan referencia a la supervivencia de las células madre hematopoyéticas humanas en el líquido extracelómico de babuino. De los resultados encontrados en el apartado 5.3 de la sección de resultados, se remarcen tres hechos fundamentales: 1) en torno a las 20 horas de incubación de las células hCD34+ en el líquido extracelómico, sobrevive cerca del 30% de las células; 2) de las células que sobreviven, un 72% pierden la expresión del antígeno CD34; y 3) conforme se incrementa la proporción de medio de cultivo suplementado con suero y factores de crecimiento hematopoyéticos, en las diluciones de éste con líquido extracelómico del babuino, se observa un incremento en el porcentaje de supervivencia células, así como, una disminución en la pérdida de expresión del antígeno CD34+ en las células cultivadas. Dado que el saco vitelino, durante el desarrollo embrionario precoz, representa uno de los tejidos hematopoyéticos primarios, y que éste, se encuentra dentro de la cavidad extracelómica, sería de esperar que el líquido extracelómico proporciona un microambiente óptimo para el mantenimiento y la proliferación de las células madre hematopoyéticas.

Haciendo una revisión del contenido molecular del líquido extracelómico en gestantes humanas y primates durante el primer trimestre de gestación, se generó un catálogo de solutos presentes en la cavidad extracelómica (ver **tablas 19, 20 y 21** y **figuras 40 y 41**). Tras analizar la distribución de las moléculas en sangre materna y el líquido extracelómico, se observó que la membrana corio-decidual se comporta como una membrana semipermeable, y que la distribución de los gradientes de concentración en uno u otro espacio es similar para cada molécula medida en ambas especies (228). El carácter de membrana semipermeable, queda demostrado por el hecho de que las moléculas de bajo peso molecular como la urea, la glucosa o los electrolitos, responsables de la osmolalidad, están distribuidas de forma similar en el suero materno y el líquido extracelómico. La distribución de proteínas en ambos fluidos

es, por el contrario, significativamente distinta, y con un gradiente global aproximado de 18:1 (suero materno 18: líquido extracelómico 1). A su vez, cada proteína presenta un gradiente particular dependiendo de su origen y, probablemente también, de las variaciones funcionales que van ocurriendo a lo largo del embarazo (178, 229). Así, por ejemplo, las proteínas totales y la pre-albúmina aumentan en el líquido extracelómico durante el primer trimestre del embarazo a pesar de que sus niveles en suero materno disminuyen por la hemodilución fisiológica que ocurre durante este periodo. Estos hallazgos sugieren que los cambios protéicos en el líquido extracelómico son independientes de los que cambios que ocurren en el suero materno (133, 230). Proteínas específicas de origen trofoblástico, como el lactógeno placentario, la activina A y la inhibina están más elevadas en el líquido extracelómico que en el suero materno. La hormona hCG, no sólo aumenta en el espacio extracelómico durante el primer trimestre del embarazo, si no que alcanza niveles hasta 185 veces más elevados que en suero materno. La vitamina B12, la prolactina y la proteína placentaria 14, que son de origen decidual, están también más elevadas en el líquido extracelómico que en el suero materno. Los niveles de estradiol y progesterona, por el contrario, disminuyen en líquido extracelómico a lo largo del primer trimestre del embarazo (179, 188)

Dada las necesidades de expansión celular de las estructuras embrionarias y embrionarias durante el primer trimestre de gestación, se han estudiado la presencia de los diferentes aminoácidos y factores de crecimiento como los “*insulin-like growth factors*” (IGFs) y sus “*binding proteins*” (IGFBP-1). Existe transporte activo de aminoácidos de la madre al embrión que se acumulan en el líquido extracelómico (176, 191). También se ha demostrado que los IGFs se encuentran en concentraciones más elevadas en el líquido extracelómico que en el suero materno (193, 231-233). Además, se sabe que en suero materno hay niveles más elevados de la forma fosforilada de IGFBP-1, mientras que en el líquido extracelómico los niveles de la IGFBP-1 no-fosforilada son los más elevados. Esto indica una inhibición de la función biológica de IGF-II en la madre y disponibilidad de IGF-II en líquido extracelómico (231).

La capa endodérmica del saco vitelino es también capaz de sintetizar proteínas similares a las que producirá el hígado fetal. Estas proteínas, que incluyen una isoforma de la alfa-fetoproteína (AFP), alfa1-antitripsina, albúmina, pre-albúmina y la transferrina, son secretadas mayoritariamente al entorno embrionario, contribuyendo muy poco al conjunto de

las proteínas plasmáticas maternas (234, 235). Por el contrario la AFP embrionaria, que puede ser diferenciada de la producida por el saco vitelino, debido a su elevado peso molecular (± 70 kDa), se distribuye entre los líquidos amniótico, extracelómico y suero materno (236).

Finalmente, moléculas tan variadas como las hormonas tiroideas maternas, el hierro, factores del complemento, la relaxina y algunas inmunoglobulinas específicas IgG, IgM e IgA contra el *Toxoplasma Gondii*, Citomegalovirus o Rubéola, también han sido medidas en el líquido extracelómico antes de la 12ª semana de gestación, demostrando que proceden del compartimento materno, debido a la incapacidad, tanto del embrión, como del saco vitelino de estos compuestos en este estadio del embarazo (201, 237).

Una de las limitaciones más importantes de este trabajo ha sido la carencia de estudios previos que se hayan realizado, en animales babuinos, dado su elevado coste y su reducido número. Gran parte del material presentado en esta Memoria, intenta validar el modelo animal babuino gestante como un adecuado sustituto del modelo humano, y muchos de los objetivos cumplidos, no habían sido abordados con anterioridad, por lo que no se encuentran referentes en la literatura. El babuino presenta similitud con el humano en relación a la placentación, desarrollo embrionario, sistema reproductor, sistema endocrino e inmunológico (101, 137, 238, 239). Su gran tamaño, facilita la realización de múltiples técnicas diagnósticas y de control gestacional, que en la actualidad se utilizan de forma habitual en gestaciones humanas, así como realizar el trasplante de células hCD34+ en la cavidad extracelómica, entre los 36-44 días postfecundación, equivalentes a las 6ª-8ª semanas postfecundación en humanos.

Se ha descrito que entre los estadios de Carnegie 17 y 23 del desarrollo embrionario, los parámetros ecográficos embrionarios y extraembrionarios, tanto en gestaciones humanas, como en babuinos, presentan una elevada similitud (ver **tabla 22** y **figura 42-48**). Este hecho es básico realizar estudios durante el primer trimestre de gestación, en particular, la experimentación de técnicas invasivas ecoguiadas antes de ser experimentadas en humanos, evitando así el riesgo de pérdida fetal precoz o anomalías congénitas secundarias al procedimiento. Se ha demostrado, además, que partir del segundo trimestre y dado que el periodo gestacional de los babuinos es aproximadamente 90 días menor que los humanos, los parámetros ecográficos obtenidos en ambas especies se van diferenciando conforme avanza la

gestación (**Tabla 23**). Debido a dichas diferencias, no resultaría útil la fórmula de Handlock para el cálculo del peso estimado fetal utilizada de forma habitual en humanos, para estimar el peso fetal en babuinos, pero a la espera nuevos estudios para estimar el peso fetal en el animal, los resultados obtenidos tras utilizar la fórmula en babuinos dieron un resultado orientativo para calcular la dosis de células inyectadas por Kg de peso fetal (**Tabla 32**). Por el contrario, el intervalo de confianza del 95% de la media de los parámetros hematológicos en individuos humanos sanos resultaría útil para predecir y diagnóstica la aparición de cualquier anomalía en el torrente sanguíneo del modelo animal. De igual forma, cambios en los niveles de citocinas u hormonas medidos antes y después de la celocentesis, en sangre periférica de babuinos gestantes podrían ser útiles para controlar las complicaciones tras el procedimiento.

Cuanto mayor es la precocidad en el diagnóstico prenatal de cualquier defecto genético, más fácil se hace para el paciente tomar una decisión en el manejo médico de la gestación. Se ha demostrado que mediante la utilización de la celocentesis pueden diagnosticarse anomalías citogenéticas en un período previo al diagnóstico por amniocentesis o biopsia de corion (101, 228, 240). De forma experimental, las celocentesis en humanos, se han realizado, en pacientes que habían decidido interrumpir posteriormente la gestación, entre la 4^o y 8^o semana postfecundación (**Tabla 46**). Atkinson et al (241), del Hospital Universitario St. James en Leeds, fueron los primeros en mostrar una tasa de éxito de un 65% en los análisis citogenéticos de las muestras de líquido extracelómico obtenidas entre la 7^a y la 9^a semana de gestación. Gruger et al mostraron una tasa de 90% de éxito en cultivos y análisis citogenéticas de muestras obtenidas entre la 6^a y la 10^a semana de embarazo, y cuando las células extracelómicas se cultivaban en presencia de medio de cultivo de fibroblastos (242). Estos autores sugirieron que este método provisto de los factores de crecimiento fibroblástico resultó esencial para el crecimiento *in vitro* de las células extracelómicas. Más recientemente, los mismos autores diagnosticaron un caso de Síndrome de Turner a las 9 semanas de gestación mediante estudios citogenéticos y análisis por FISH de los cromosomas 18, 13/21, X e Y, en células extracelómicas no cultivadas (164, 243). Makrydimas et al (244) diagnosticaron embriones afectados de β -talasemia a las 7 semanas de gestación, en parejas portadoras del gen afecto. Curiosamente, estos autores excluyeron la contaminación materna, demostrando la distribución alélica esperada del gen de la apolipoproteína B (ApoB) paterna en las células analizadas. Este grupo también ha realizado test de paternidad analizando los modelos de segregación, paterno y materno, de los alelos del gen de la trombopoyetina (TPO)

y ApoB en las células extracelómicas (245). Lau et al obtuvo un 91% de éxito en la determinación del sexo fetal usando la amplificación por PCR de una secuencia específica del cromosoma Y en las muestras de líquido extracelómico. Entre sus resultados, figuran un resultado falso positivo y dos resultados falsos negativos, relacionados con una posible contaminación de células maternas y el tamaño insuficiente de la muestra (246).

Tabla 46. Resultados de los estudios de diagnóstico prenatal realizados en gestaciones humanas durante el primer trimestre de gestación vía celocentesis.

N	Edad gestacional (semanas postfecundación)	Volumen ml (rango)	Vía de abordaje	Tipo de estudio	Diagnóstico	Referencia
30	8 - 10	3 – 8.3	Vaginal	Citogenéticos (n=10) FISH (n=10) PCR (n=10)	Sexo fetal	(247)
58	7 - 10	0,5 – 2,5	Vaginal	PCR	Anemia falciforme	(248)
32	7 - 10	ND	Vaginal	FISH	Sexo fetal	(249)
20	8 - 11	5,5 (media)	Vaginal	Citogenéticos	Estudio del cariotipo fetal	(241)
30	6 - 10	1.5 - 10	Vaginal	Citogenéticos	Estudio del cariotipo fetal	(242)
25	7 - 10	3 – 10	Vaginal	PCR	Sexo fetal Diagnóstico de Fibrosis Quística	(250)
1	9	ND	Vaginal	Citogenéticos	Síndrome de Turner	(243)
26	6 -10	0,5 - 10	Vaginal	FISH	Estudio de los cromosomas sexuales y los autonómicos 18, 13 y 21	(164)
4	7 - 9	1	Vaginal	PCR	Beta Talasemia	(244)
35	6 - 10	0,5 – 3	Vaginal	PCR	Sexo fetal	(246)
17	ND	ND	Vaginal	QF-PCR	Estudio de los cromosomas sexuales y los autonómicos 18, 13 y 21	(251)
20	7 - 9	2 - 3	Vaginal	PCR	Estudio de paternidad basado en el diagnóstico de los polimorfismo del gen de trompoboyetina y Apolipoproteína B	(245)

N: número de pacientes; ND: no descrito. FISH: Hibridación in-situ con fluorescencia; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; QF-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Fluorescencia.

Los resultados obtenidos en esta memoria han demostrado que al igual que en el humano, existen células vivas en el líquido extracelómico, que su número es muy limitado y, que el tiempo necesario de cultivo, previo al análisis citogenético puede ser relativamente largo (**Tabla 26**). Esto último resulta un factor limitante del aprovechamiento clínico de la celocentesis a la hora de realizar un diagnóstico prenatal precoz, por lo que se recomiendan

nuevos estudios sobre la biología de estas células para incrementar su capacidad de proliferación *in vitro* (242).

A diferencia de los estudios realizados en humanos, el modelo animal babuino facilita la realización de la celocentesis mediante el abordaje, tanto transvaginal, como transabdominal. El riesgo inherente a la técnica, ha estado sujeto a controversia durante los últimos años (101, 157, 160, 162, 245). En humanos, el riesgo de pérdida embrionaria secundaria al procedimiento se sitúa entre 3-20%. En estos pacientes, la técnica se realizó de forma experimental, por lo habían consentido interrumpir la gestación, no pudiendo valorar la evolución a largo plazo y el abordaje fue transvaginal. En babuinos, Santolaya et al (101, 157) encuentra un riesgo de pérdida se sitúa alrededor del 3%, a pesar del enfoque experimental, ha podido realizar un seguimiento continuo de la gestación hasta el momento del parto y como se ha observado en esta Memoria el abordaje transabdominal es más segura y la dificultad técnica es mucho menor (**Tabla 26**) (Datos pendientes de publicar).

En relación al trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas, la experiencia humana es limitada (**Tabla 47**). Cincuenta fetos humanos han sido tratados con resultados muy dispares si se mide la tasa de injerto que se obtuvo en el recién nacido. El éxito o no del trasplante ha sido atribuido a la naturaleza de la enfermedad que se ha querido tratar; a la edad gestacional en el que se intentó el trasplante; al número, procedencia y fenotipo de las células madre transplantadas; a la vía de administración utilizada y finalmente, al seguimiento realizado en cada caso. En general, para las inmunodeficiencias, la tasa de injerto ha sido favorable ya que en estos existe una clara ventaja proliferativa de las células del donante frente a las del receptor (252). Sin embargo, en el resto de las entidades la respuesta fue pobre y queda por demostrar si se alcanzó “*tolerancia inmunológica*” que pudiera facilitar la realización de trasplantes postnatales (253, 254). Es por ello que el trasplante *in utero* de células madre hematopoyéticas se encuentra en fase experimental quedando por definir el uso o incremento cuantitativo y/o cualitativo de las células madre hematopoyéticas apropiadas que permita garantizar mayores tasas de injerto sin incrementar el riesgo de pérdida del embarazo. Mientras tanto, este tipo de estudio debería de demostrar su utilidad en animales.

Tabla 47. Resultados en trasplantes *in utero* de células madre hematopoyéticas en humanos.

Entidad patológica	EG (semanas)	Fuente de células madre	Injerto	Superv	Autor	Año	Ref.
Isoinmunización Rh	17	Médula ósea materna	No	Si	Linch et al.	1986	(255)
Síndrome del linfocito desnudo	30	Hígado y timo fetal	Si	Si	Touraine et al.	1989	(256)
Inmunodeficiencia combinada severa	28	Hígado fetal	Si	Si	Touraine et al.	1991	(252)
Inmunodeficiencia combinada severa	20	Médula ósea materna	No	TEE	Diuktnan and Golbus	1992	(257)
α talasemia	18	Médula ósea materna	Si	TEE			
Enfermedad de Chediak-Higashi	19	Médula ósea materna	No	Si			
β Talasemia	25	Médula ósea hermano	No	Si	Slavin et al.	1992	(258)
β Talasemia	18	Hígado fetal	ND	No			
Leucodistrofia metacromática	37	Médula ósea paterna	No	Si			
Leucodistrofia metacromática	23	Médula ósea paterna	No	Si			
Isoinmunización Rh	12	Médula ósea materna	No	Si	Thilagantan and Nicolides	1993	(259)
β talasemia	14	Hígado fetal	ND	No	Cowan and Golbus	1994	(260)
Síndrome de Hurler	14	Hígado fetal	No	Si			
α talasemia	15, 31	Hígado fetal	No	Si	Westgren et al.	1996	(261)
β talasemia	18	Hígado fetal	No	Si			
Anemia falciforme	13	Hígado fetal	No	Si			
Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X	14	Hígado fetal	Si	Si			
Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X	16, 17.5 y 18.5	Médula ósea paterna	Si	Si	Flake et al.	1996	(254)
Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X	21, 22	Médula ósea paterna	Si	Si	Wengler et al.	1996	(262)
Inmunodeficiencia combinada severa	23, 24	Médula ósea paterna	Si	Si			
Enfermedad granulocítica crónica	17, 21	Hígado fetal	ND	No	Touraine	1996	(263)
Chediak-Higashi	19	Médula ósea materna	No	Si	Flake and Zanjani	1997	(13)
Leucodistrofia globuloide	14	Médula ósea paterna	Si	No	Bambach et al.	1997	(264)
α talasemia	13, 19 y 24	Médula ósea paterna	Si	Si	Hayward et al.	1998	(265)
β talasemia		Médula ósea paterna	No	Si	Monni et al.	1998	(266)
Leucodistrofia globuloide	13	Médula ósea paterna	No	Si	Leung et al.	1999	(267)
Leucodistrofia globuloide	13	Médula ósea paterna	No	Si			
Inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X	14	Hígado fetal	Si	Si	Westgren M et al	2002	(6)

IEE: Interrupción electiva del embarazo; EG: edad gestacional en el momento del trasplante; Super: supervivencia; ND: No determinado

Estudios realizados en modelos animales han demostrado que el tratamiento *in utero* utilizando células madre hematopoyéticas es posible (87, 267-269). La ventaja de los experimentos en los que se trasplantan células humanas en animales de experimentación, han conseguido demostrar 1) el desarrollo y evolución *in utero* del sistema hematopoyético humano, debido a que durante el periodo gestacional dicho sistema es multifocal (diferentes órganos hematopoyéticos) y presenta una amplia variedad en su capacidad multilineal, 2) la respuesta de el sistema hematopoyético a los factores de crecimiento hematopoyético u otras citocinas, 3) que es posible la tolerancia inmunológica al *xenotrasplante* durante el periodo gestacional vs el periodo postnatal, con una menor morbilidad y 4) la validez de modelos animales que simulan modelos de enfermedad, como la inmunodeficiencia combinada severa, para representar entidades patológicas en humanos (13, 270)..

Entre los estudios de *xenotrasplante* existe una amplia variedad metodológica utilizada, tanto en el modelo animal como en el resto de variables. La **tabla 48** describe los diferentes estudios realizados en animales de experimentación en los que, al igual que en éste trabajo, se han trasplantado células humanas en los distintos animales. Como puede observarse en la tabla, existe una amplia variedad en el porcentaje de *xenoquimerismo* detectado, tanto en sangre periférica como en médula ósea, e inclusive en muchos de los trabajos no se describe dicho porcentaje, a pesar de poder detectar la presencia de células o DNA humano en el animal.

Tabla 48. Estudios de *xenotrasplante hematopoyético in utero* (humano-animal)

Modelo	Fuentes de células madre hematopoyéticas humanas	Porcentaje de casos en los que se alcanza el injerto	Cuantificación del Porcentaje de quimerismo	Autor	Año	Ref
Oveja	MOA.	43 %	6%SP	Srouf, et al	1992	(271)
Oveja	CMHF	40%	13 – 33 %SP	Zanjani, et al	1992	(272)
Oveja	MOA	33%	ND	Srouf, et al	1993	(273)
Rata	CMHF	29%	ND	Pixley, et al	1994	(274)
Oveja	CMHF + FC	40%	ND	Flake, et al	1995	(32)
Babuino	Hígado fetal	33%	1,5%SP/MO	Shields, et al	1995	(239)
Oveja	FL- <i>in utero</i> tras <i>xenoquimerismo</i> previo	33%	ND	Zanjani, et al	1995	(275)
Oveja	EMA	28%	ND	Almeida, et al	1996	(276)
Oveja	MOA	49%	ND	Kawashima, et al	1996	(18)
Oveja	MOA	60%	1- 0,0001%SP	Bernstein, et al	1997	(277)
Rata	MOA	29 %SP, 4,12 % MO 7,14 % timo	0,1-2,93%SP	Pixley, et al	1998	(278)
Rata	MOF Hígado fetal	12% MO, 10% hígado 86,6 % bazo	ND	Turner, et al	1998	(279)
Perro	MOA/RETROVIRUS	100% SP/MO	SP 38% to 0,05% MO 20% to 0,05% (10-44 semanas)	Omori, et al	1999	(280)
Macacos	SPA	100%	0,1-1,7%SP	Tarantal et al	2000	(281)
Oveja	EMA	80 %	ND	Liechty, et al	2000	(282)
Oveja	MOA y EMA	43%	ND	Almeida et al	2000	(268)
Cabra	UCB	1-3%	ND	Huang, et al	2002	(283)
Oveja	MOA y EMA	40%	ND	MacKenzie, et al	2002	(284)
Oveja	Cordón umbilical	100 %	6-32%SP/MO	Noia G et al	2003	(95)
Cerdos	Cordón umbilical	66%	0,1-2%SP	Fujiki, Y. et al	2003	(285)

MOA: médula ósea de adultos; MOF: médula ósea fetal; CMHF: células madre hematopoyéticas fetales; FC: factores de crecimiento hematopoyéticos; EMA: estroma medular adulto; SPA: sangre periférica del adulto; SP: sangre periférica; MO: médula ósea.

Durante los primeros años de investigación en este campo, el trasplante *in utero* de células en el animal se realizaba mediante cirugía abdominal. En la mayoría de los casos el útero era exteriorizado y se realizaba la técnica a “cielo abierto”, tras una histerotomía mínima. La aparición de los equipos ecográficos de alta definición así como de las técnicas invasivas ecoguiadas, ha facilitado el abordaje al feto animal, con menor morbilidad y hoy en día, los estudios se centran en conseguir acceder al embrión durante un estadio preinmune y garantizar un mayor porcentaje de injerto y de quimerismo. La **tabla 49** describe los estudios de *xenotrasplante* ecoguiados. Noia et al (95) supone el único equipo que ha reproducido parte del enfoque metodológico presentado en esta Memoria, accediendo al espacio extracelómico en un periodo anterior al tercio del periodo gestacional en la oveja, considerándolo como pre-inmune. En el resto de los casos, el abordaje se ha realizado de mediante funiculocentesis o transperitoneal.

Tabla 48. Estudios de xenotrasplante (humano-animal) en los que se han inyectado *in utero* células madre hematopoyéticas mediante procedimientos invasivos ecoguiados.

Modelo	Edad gestacional (Días postfecundación)	Duración de la gestación (días)	% del período gestacional en el momento del procedimiento.	Fuente de células madre hematopoyéticas humanas	Porcentaje de injerto	Autor	Año	Ref.
Babuino	85-104	180	47-57	Hígado fetal	33%	Shields, et al	1995	(239)
Macacos	50-56	165	30-34	Sangre periférica de adulto	100%	Tarantal et al	2000	(281)
Oveja	55-60	145	38-41	Médula ósea y estroma medular	43%	Almeida et al	2000	(268)
Cabra	55-65	150	47-43	Cordón umbilical	1-3%	Huang, et al	2002	(283)
Oveja	40-45	145	28-31	Cordón umbilical	100 %	Noia G et al	2003	(95)
Cerdos	52	114	45	Cordón umbilical	66%	Fujiki, Y. et al	2003	(285)

Tras realizar el trasplante de células hCD34+ en el babuino se encontró un porcentaje de pérdida del 25% muy similar a los que se publican en otros estudios, inclusive en el de Noia et al, a pesar de que hay que considerar que este autor no señala el riesgo propio de la técnica ni hace ningún comentario en referencia a las pérdidas gestacionales en su trabajo (95). Dado que este porcentaje es mayor del esperado por haber realizado la celocentesis, se analizaron otras variables de estudio. Se observó que no existía relación directa con la variedad del grupo sanguíneo, ni el número de células hCD34+ inyectadas (**Tablas 32, 38 y 39**). Por el contrario, la expansión celular *ex vivo* previa al trasplante, un porcentaje elevado de células CD3+ y más concretamente de células NK (CD3+CD56+) resultaron factores comunes en ambos casos de abortos (**Tablas 32, 40-42**).

Como se ha mencionado en pacientes humanos, el menor tiempo en lograr el injerto, y la mejor supervivencia, tras el trasplante, se han conseguido tras administrar una dosis por encima de 2×10^6 células CD34+ por Kg de peso, algo similar a lo que ocurre en los modelos animales, en el que habitualmente se dan mayores dosis (30, 95, 285). De forma experimental, se han demostrado, además, que el éxito en alcanzar el injerto, también se asocia a un número determinado de células T (CD3+). Por ejemplo, en el caso de estudios de trasplante intrauterino de células madre hematopoyéticas alogénicas en primates, este número es 10^6 - 10^7 células T/Kg de peso estimado fetal. Dosis por encima de 10^8 células T/Kg, se han asociado a

la muerte del huésped, que se manifiesta como *hidrops fetalis* e infiltrados linfocíticos en los estudios histológicos (286). Aunque aún no pueden ser extrapolados a los estudios de trasplante postnatal en humanos, la influencia de las células T en la evolución del trasplante *in utero*, esta siendo estudiada en otros animales, con resultados muy similares a los estudios en primates. Entre los estudios humanos de trasplante *in utero* que hagan referencia a este hecho, una dosis cercana de 10^8 células T/Kg fue nefasta, con resultado de muerte intrauterina con injerto masivo (264). En la **tabla 32** se resumen las características de las células inyectadas por cada animal. En los casos de aborto la dosis de células CD3+ fue de $7,1 \times 10^6$ y 15×10^6 células/Kg, respectivamente a diferencia del resto de los animales en los que la dosis fue menor a 10^8 células CD3+/Kg.

Las células NK son células del sistema linfóide, capaces de matar células no propias, propias infectadas o tumorales, por lo que han sido relacionadas con el rechazo de trasplantes de médula ósea postnatal (287). El papel de las células NK en el trasplante *in utero*, no ha sido aún explorado. Estas células aparecen en el hígado alrededor de la 6ª semana de gestación, y representan entre el 35 y el 75 % de las células CD45+ hepáticas entre las 6 y 24 semanas (56). La observación que demuestra que las células NK representan un 29 % de los linfocitos, en sangre fetal a las 13 semanas de gestación, y un 6 % a término, puede sugerir que las células NK representen una primera línea de defensa durante el desarrollo embrionario (288). En la sangre de cordón umbilical las células NK presentan una capacidad destructiva limitada durante las primeras 24 horas de vida neonatal, pero a diferencia de las células T que también presentan un estado de inmadures, estudios de cultivos de ambos tipos celulares ha puesto de manifiesto que ante la presencia de antígenos y ante el incremento de IL-2 e IL-12, la capacidad inmunocompetente de las NK es mayor que la de los linfocitos T (289, 290). En los casos de abortos, el porcentaje de células NK presentes en las células trasplantadas eran entre 3 y 8 veces superiores al resto de los casos (**Tabla 42**).

Se ha demostrado que es posible trasplantar células madre hematopoyéticas hCD34+ durante el periodo preinmune y nuevamente retrasplantar una nueva dosis de células durante el periodo inmune. Dadas las limitaciones temporales de estudios, los resultados únicamente permiten especular que que en este animal, el primer trasplante pudo inducir la tolerancia inmunológica, lo que facilitó el retrasplante posterior y que en el casos que esto pueda ocurrir, se podrían realizar nuevos retrasplantestanto prenatales como postnatales, de similar tejido o de otros órganos, pero este hecho debe de ser demostrado con pruebas de tolerancia

postnatales y comparados los resultados con los obtenidos en animales en los que no se retrasplantan (291, 292).

Se ha demostrado que las células hCD34+ sobreviven *in vitro* en el líquido extracelómico del babuino, y que la tasa de supervivencia celular se incrementa de forma proporcional con el porcentaje de medio de cultivo y factores de crecimiento en diluciones con dicho líquido extracelómico (**Tabla 18** y **Figura 39**). Además, se demostró que el líquido extracelómico del babuino puede ser sustituido parcialmente y temporalmente por medio de cultivo y líquido extracelómico, con intención de mejorar *in vivo* el microambiente en el que se trasplantan células madre hematopoyéticas en el babuino gestante. En estos casos, se desconoce la cinética de proliferación *in vivo* y si son válidos los resultados *in vitro* por el que cabría preguntar, si un 30% de células hCD34+ al cabo de 20 horas son suficientes para lograr el *xenoquimerismo*. Metodológicamente es posible el recambio de al menos del 50% del líquido extracelómico lo que sería útil para mejorar el porcentaje de supervivencia y el tiempo de supervivencia de las células madres inyectadas, aunque se requieren más estudios para demostrarlo. Nuevamente, no se pueden comparar estos resultados por falta de estudios similares.

Mediante los estudios de detección del grupo sanguíneo Rh+, cariotipo, citogenética molecular y genómicos, se pueden detectar células humanas en sangre del babuino. Dependiendo de la técnica utilizada se puede detectar entre 1 en 10⁶ o 5 en 100 células. En la actualidad, utilizando los anticuerpos monoclonales habituales, la detección de *xenoquimerismo* humano-babuino no es fiable debido a la inespecificidad de los anticuerpos monoclonales en relación a una u otra especie.

En ninguno de los recién nacidos sometidos a trasplante *in utero* de células hCD34+ vía celocentesis pudo detectarse *xenoquimerismo*, quedan por conocer los resultados en el resto de los animales trasplantados. Se desconocen las razones por las que no pudo obtenerse células humanas en el animal y el porque de las diferencias con otros estudios de *xenotrasplante*. Se proponen realizar nuevos estudios para la detección de los posibles quimerismo, basados en técnicas con mayor fiabilidad.

7. CONCLUSIONES

- I. El número total de células CD34+ procedentes de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos sanos a término y sin complicaciones perinatales, se correlaciona de forma directamente proporcional, con el volumen de sangre del cordón umbilical recogido (N° total de CD34+ = $1,2 \times \text{ml de sangre} + 14,680$; $R^2:57$; (p: 0,003)). El número total de células CD34+ por ml de sangre se correlaciona de forma directamente proporcional con el peso placentario (N° total de CD34+ por ml de sangre = $58,2 \times \text{peso placentario (gramos)} + 12870$; $R^2:59\%$; (p: 0,001) y es independiente del resto de variables clínicas obstétrico-neonatales
- II. Tras la expansión *ex vivo* de células hCD34+ procedentes de cordones umbilicales sanos, durante 7 y 14 días de incubación, la tasa de proliferación celular fue de dos y diez veces, respectivamente, con un porcentaje de pérdida en la expresión de CD34 del 78% al cabo de 14 días de incubación, sin que pudieran demostrarse diferencias entre las distintas condiciones de cultivo. Además, tras 21 días de incubación y nueva selección de células CD34+ por métodos inmunomagnéticos, se obtiene un incremento de cinco veces el número de las células CD34+ al inicio del cultivo.
- III. La membrana corio-decidual se comporta como una membrana semipermeable y el espacio extracelómico es un espacio selectivo y dinámico dentro del saco gestacional, cuyas características bioquímicas responden a las necesidades del embrión en desarrollo.
- IV. El modelo babuino se convierte en un excelente sustituto del modelo humano durante el periodo gestacional, para la realización de diversos estudios de diagnóstico prenatal, trasplante de células madre hematopoyéticas vía celocentesis y fisiología feto-materna durante la gestación. Esto viene determinado por los siguientes hallazgos:
 - a. El control evolutivo del desarrollo ecográfico del embrión babuino, entre los días 35 y 47 postfecundación, puede realizarse de forma similar al embrión humano durante el periodo correspondiente al 17 y 23 estadios de Carnegie.
 - b. En los babuinos, el momento más seguro para realizar la celocentesis se sitúa en torno a los 40 días post fecundación, que coincide con un periodo embrionario preinmune.
 - c. El paralelismo entre los resultados ecográficos, biométricos y hematológicos, entre el modelo animal y el humano, permite establecer normogramas de

- seguimiento y control en aquellos casos en que se vaya a realizar cualquier tipo de estudio experimental prenatal.
- d. En el modelo animal, el diagnóstico prenatal de cromosomopatías, utilizando células procedentes de la cavidad extracelómica, puede hacerse alrededor de los 40 días postfecundación. Sin embargo, se requieren nuevos estudios que se centren en conocer la biología de estas células, así como de las condiciones de cultivo, con el fin de poder disminuir el tiempo de cultivo necesario para que la técnica tenga utilidad clínica.
 - e. Cerca de un tercio de las células hCD34+ sobreviven *in vitro* en el líquido extracelómico del babuino al cabo de 20 horas. La supervivencia celular y el porcentaje de células que expresan CD34 aumenta conforme existe una mayor proporción de medio de cultivo en el líquido extracelómico.
 - f. La modificación *in vivo* del líquido extracelómico del babuino, mediante la introducción de medio de cultivo y factores de crecimiento hematopoyéticos, podría garantizar una mayor supervivencia de las células progenitoras inyectadas, y con ello la capacidad de conseguir el injerto.
- V. El trasplante de células madre hematopoyéticas hCD34+ en el espacio extracelómico del babuino, alrededor de los 40 días de gestación, se asocia a un 25% de pérdida embrionaria.
- VI. La expansión *ex vivo* de las hCD34+ previa a la inyección, un porcentaje elevado de células CD3+, así como un porcentaje elevado de células NK fueron características comunes en los casos de pérdida gestacional tras el procedimiento.
- VII. Mediante los estudios de detección del grupo sanguíneo Rh+, cariotipo, citogenética molecular y genómicos, se pueden detectar células humanas en sangre del babuino.
- VIII. En los casos en los que se haya establecido *xenoquimerismo* el porcentaje de células humanas en los animales es inferior al 0,1%.

8. ANEXOS

8.1. Protocolos de estudio en humanos

8.1.1. Protocolo de estudio de las variables clínico-analíticas materno neonatales tras el parto en los dos hospitales pertenecientes a la ciudad de Amarillo, (Texas, EE.UU.)



Office of Sponsored Programs
1400 Wallace Boulevard
Amarillo, Texas 79106
(806) 354-5419
FAX (806) 354-5549

September 13, 2002

Joaquin Santolaya, MD
TTUHSC – Department of Obstetrics and Gynecology
1400 Coulter
Amarillo, Texas 79106

IRB #: 1823
Antepartum & Postpartum Retrospective Chart Review

RE: ACKNOWLEDGEMENT- EXPEDITED APPROVAL

Dear Dr. Santolaya,

The information received by the IRB in the above named protocol have been reviewed and have been given expedited approval as allowed under 45 CFR 46.110(b).

The approved changes are as described in your letter of July 10, 2002 and include Change in Principal Investigator and addition of BSA Health Care System as an investigative site with a letter of acceptance from BSA.

Please inform the IRB office immediately of any adverse situations. Also, the protocol may not be altered without the approval of the changes by the IRB.

Please call the Amarillo Office of Sponsored Programs at 354-5419 with any questions.

Sincerely,

Brian Pruitt, MD
Chairman, Amarillo Institutional Review Board

8.1.2. Protocolo de extracción de CD34+ de la de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos.



Office of Sponsored Programs
1400 Wallace Boulevard
Amarillo, Texas 79106
(806) 354-5419
FAX (806) 354-5549

January 9, 2003

Joaquin Santolaya, MD
TTUHSC – Department of Obstetrics and Gynecology
1400 Coulter
Amarillo, Texas 79106

IRB # 2041
Hematopoietic Gene Therapy

FULL APPROVAL – EXEMPT PROTOCOL

Dear Dr. Santolaya,

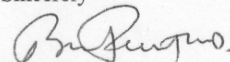
The Amarillo Institutional Review Board (IRB) reviewed the clarifications that were submitted for the protocol listed above. This is per the letter submitted to the IRB dated December 13, 2002 and includes verification that no subject identifiers will be used in this study. The IRB determined this protocol to meet the criteria for exemption from continued review.

Under current ethical guidelines and federal regulations, your investigation involving human subjects as described in the above named protocol is exempt from continued IRB review as allowed under 45 CFR 46.101 (b). Please note, any changes to this protocol must be submitted to the IRB prior to implementation.

Upon receipt of this letter, your research involving human subjects may begin.

Annual review will not be required. Please inform the IRB office immediately of any adverse situations or changes.

Sincerely


Brian Pruitt, MD
Chairman, Amarillo Institutional Review Board



8.1.3. Protocolo de estudio bioquímico y endocrinológico de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos humanos.



Institutional Review Board
1400 Wallace Boulevard
Amarillo, Texas 79106-1797
(806) 354-5419

June 19, 2003

Joaquin Santolaya, MD
TTUHSC – Department of OB/GYN
1400 Coulter
Amarillo, Texas 79106

IRB # 3032
Fetal Maternal and Placental Endocrinology at Normal Term Delivery

NEW PROTOCOL – IRB REQUEST FOR CHANGES

Dear Dr Santolaya,

The Amarillo Institutional Review Board (IRB) reviewed the above named protocol for human research at its June 19, 2003 meeting, and requests the clarification and/or changes identified on the following page.

Please make the necessary changes in the application and/or consent form, as requested. Return one copy of the corrected protocol and consent form to the IRB office no later thirty days from receipt of this letter.

Research involving human subjects must not begin before full approval is granted in writing, and you are advised that subject participation may begin.

Sincerely

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Barbara Rohland".

Barbara Rohland, MD
Acting Vice-Chairman, Amarillo Institutional Review Board

An EEO / Affirmative Action Institution

8.2. Protocolos de estudio en los animales de experimentación

University of Oklahoma

**LABORATORY ANIMAL USE STATEMENT
THE UNIVERSITY OF OKLAHOMA HEALTH SCIENCES CENTER
INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE
LABORATORY ANIMAL USE STATEMENT**

For IACUC Use Only		
Review Date: _____	Approval Date: _____	Protocol # _____

VA. PLEASE PROVIDE THE FOLLOWING INFORMATION: (TYPEWRITTEN ONLY)

1. Principal Investigator and Co-investigators: PI: Joaquin Santolaya-Forgas MD, PhD. Co-I: Juan De Leon-Luis.

2. College: A. Texas Tech University Health Sciences Center Department: OB/GYN
1400 Coulter Amarillo Texas Bldg/Room: TTUHSC 2430

3. Office Phone #: (806) 356-4608 Home Phone #: (806) 374-7373

4. Title of Project: Feasibility of very early in-utero gene therapy using erythropoietic stem cells (CD34)

5. Funding Source: Texas Tech University Health Sciences Center at Amarillo

6. Effective Period: From: December 2003 To: October 2005

7. Please check the category that best describes this study:

A. ☐ Study involves no pain or distress to animals: injections or blood sampling on unanesthetized animals; euthanasia by anesthetic overdose, decapitation or cervical dislocation; behavioral testing without restraint or noxious stimuli.

B. ☒ Study involves pain or distress for which appropriate anesthetic, analgesic or tranquilizing drugs are used: includes experiments with anesthetized animals which do not recover and survival surgery, the latter requires the use of analgesic drugs; brief restraint; noxious stimuli from which escape is possible; prolonged food or water deprivation.

C. ☐ Study involves pain or distress for which the use of appropriate anesthetic, analgesic or tranquilizing drugs would adversely affect the procedures, results or interpretation of the experiments and, thus, **these agents will not be used**: withholding of analgesia with survival surgery must be justified in detail in the text.

8. Some protocols apply to grants or contracts which are revisions being resubmitted or substantially identical applications to a different agency. Protocols fitting this description may disregard Section C, **EXCEPT** that answers to C1 and C3 are required. Please document and justify any changes in animal numbers and any changes in procedures used with animals. Protocols more than 18 months old must be rewritten completely.

Previous protocol number: University of Illinois at Chicago ACC# 98-026

9. Animal Species and Number Usage for Each Year of the Project:

<u>YEAR</u>	<u>SPECIES</u>	<u>NUMBER</u>	<u>YEAR</u>	<u>SPECIES</u>	<u>NUMBER</u>
<u>2003</u>	<u>Papio Anubis</u>	<u>5</u>	<u>2004</u>	<u>Papio Anubis</u>	<u>13</u>

10. Do the proposed experiments involve the administration of carcinogenic, suspect carcinogenic, cytotoxic, and/or antineoplastic agents to animals? YES: _____ NO: ☒

If yes, please discuss on a separate page whether significant residual amounts will be present in the animals after euthanasia and contact Animal Resources personnel regarding appropriate disposal of carcasses.

11. If hazardous chemicals or organisms are to be administered to animals while housed in the Animal Resources facilities, please discuss on a separate page whether the proper safety precautions will be taken to limit the exposure of the animal technicians to these agents. N/A

12. Does this study involve the administration of radioactive materials to animals, the use of x-rays, or the use of radioactive sealed sources? YES: _____ NO: ✓

If yes, have the radiation safety aspects been approved by the Office of Radiation Safety? YES: _____ NO: _____

13. Research will be conducted at (Building/Room): Baboons will be used from a breeding colony at The University of Oklahoma Health Sciences Center. Room: floor: Bldg. BRL (Rm To Be Assigned)

14. Length of time the animal will be removed from animal resources: 1 to 2 hours

15. Drugs to be used for surgical procedures and analgesia:

Anesthetic: <u>Ketamine I.M</u>	Dosage: <u>10mg/kg</u>
Tranquilizer: _____	Dosage: _____
Analgesics: <u>Buprenorphine</u>	Dosage: <u>0.01mg/kg SQ</u>

16. For experiments involving more than momentary pain or distress, an attending veterinarian must have been consulted to assure that the drugs and their dosages used are appropriate. Please indicate whether or not an attending veterinarian was involved at some time in the planning of all experiments involving more than momentary or slight pain or distress to animals?

YES: ✓ NO: _____

17. Section C.9f from the NIH grant application concerning the use of animals must be attached to this form for IACUC review. If you are applying to some other sponsor, attach the section from the grant application that covers animal use.

18. If there has been a review of this protocol with another IACUC, please submit a copy of the recommendation and/or approval letter.

19. **PRINCIPAL INVESTIGATOR SIGNATURE:**

(I assume responsibility for conducting this project as described and for assuring that all personnel receive appropriate training.)

B. INITIAL ACTION TAKEN:

IACUC Reviewer Date

Veterinarian Date

FINAL APPROVAL GRANTED:

Chair, Institutional Animal Care & Use Committee Date

C. JUSTIFICATION FOR THE USE OF PROPOSED ANIMAL MODEL (*use continuation pages*)

1. Provide a summary statement of the intent of the proposal (for grants attach the abstract; for others, a short paragraph.)

The purpose is to develop a primate model for *in-utero* hematopoietic stem cell therapy. Introduction of CD34 stem cells early in fetal life may correct some inherited hematological disorders including hemoglobinopathies and another congenital immunodeficiencies.

2. Significance of project (Why is this research important? What are the potential benefits?)

Hemoglobinopathies are genetic disorders with significant morbidity and mortality. It is estimated that about 300,000 severely affected children are born each year throughout the world. Currently in the USA there are more than 60,000 individuals affected with Sickle Cell Disease, which is, but one form of hemoglobinopathy. Due to the development of molecular diagnosis, hemoglobinopathies can be diagnosed prenatally.

In this study we would like to develop a technique, which may offer an *in-utero* cure for these disorders. Other authors have already attempted transfusing hematopoietic stem cells into the fetal peritoneum to cure inherited blood disorders. Transfusions of CD34 hematopoietic precursors have been performed at 14-16 weeks in human gestations and the first successful *in-utero* treatment of severe combined immunodeficiency was reported in 1996 (Flake 1996). Our hypothesis is that greater tolerance to foreign cells and increased stem cell engraftment may be possible if these cells are given before 10 weeks of pregnancy when the fetus is not immunocompetent.

The purpose of this study is to obtain preliminary information concerning the feasibility of infusing hematopoietic stem cells at about 40 days from fertilization in time pregnant baboons. We intend to isolate CD34 stem cells from human umbilical cord and transfuse them into the extra celomic space of a baboon's gestation. Erythropoietic CD34 stem cells will be isolated from human umbilical cord blood under the Texas Tech "Hematopoietic gene therapy protocol" (TT-IRB No. 2041). Changes of the extracelomic space during the early baboon's pregnancy have been reported (Santolaya, 1997a). The safety of the celocentesis procedure in this model has also been reported (Santolaya, 1997b).

3. The regulations supporting the Animal Welfare Act require that investigators using animals assure that alternatives to the use of animals for experimentation or teaching were considered and that they also assure that the experiments do not duplicate unnecessarily the experiments done by other scientists or the investigator proposing the current experiments. These regulations are being interpreted by USDA inspectors to mean that at least two data bases are to be searched and that the protocol must list the keywords used for the search and the inclusive years over which the search was conducted. Please provide the highlighted information in your protocol. If more than two data bases were searched, please list those also. Medline and Index Medicus are the same data base.

Ovid and Pubmed searches were performed between 1990 and June 2003 using the words Celocentesis & *in-utero* gene therapy [mp= title, abstract, full text, caption text with no records in Set. Please find attached documents.]

4. Justify the use of animals and describe why the species chosen are the most appropriate for the study. Briefly state your rationale for the use of animals in this study rather than other models such as bacteria, tissue culture, or computer models. For experiments using ascites production of monoclonal antibodies please address the following issues: (1) Assure the proposed use of monoclonal antibodies is scientifically justified, (2) Indicate that methods to avoid or minimize animal discomfort, distress, and pain have been considered. This includes consideration of *in vitro* methods of monoclonal antibody production. Also, please describe how many taps will be performed, how much ascites fluid will be allowed to accumulate, who will monitor the animal and for how long it will be observed after a tap is performed, and what criteria will be used to determine when an animal is in distress and needs to be euthanized, and, (3) Please explain why the *in vitro* method of monoclonal antibody production has been found unsuitable.

In this study we intend to assess the feasibility of injecting these CD34 stem cells into the extracelomic cavity of the early baboon gestation. This study may provide further insight concerning: 1) The risk of pregnancy loss, 2) Migration capacity of CD34 stem cells from the extracelomic space into the fetus via the

yolk sac and vitelline duct and, 3) Engraftment capacity of the CD34s in the embryonic baboon's hematopoietic organs. Alternatives such as computer simulations and tissue cultures cannot be used to determine if in-utero somatic gene therapy will work. In order to determine the feasibility of injecting hematopoietic stem cells into the extracoelomic space, as well as to develop the skills necessary to perform this procedure, a model which closely approximates humans in developmental characteristics and size is needed. Baboons have similar implantation, early embryologic development and placentation to humans. Baboons are also large enough to allow ultrasonographic examinations and therefore represent an optimal model for in-utero embryonic stem cell transfusion.

5. General description of projects:

Please describe your project with respect to the types of animal use given below. In the description of the project, list and justify the numbers of animals to be used. Please include in the listing both control and experimental groups and the numbers of animals in each group. Extra animals may be requested, but must be identified as such. Please provide a justification for the extra animals. (Do NOT enclose grant pages.)

A. For experiments which are category A and for experiments in which the animals are anesthetized throughout the experiment and do not recover from the anesthesia, give a general description of what will be done with the animals. Include the anesthetic procedure and describe how its adequacy is determined for maintenance. A 100 word summary is sufficient.

B. For experiments which include survival surgery describe the procedure in detail including the anesthetic procedure and post-surgical monitoring. Describe how the adequacy of anesthesia is determined and how it is maintained. List the names of analgesic drugs to be used for post-operative pain; give the doses to be used and the schedule of administration. List the names of the surgeons and anesthesiologist and the person responsible for post-surgical monitoring and administration of analgesic agents.

C. For experiments which include survival surgery without the use of post-operative analgesic drugs or those in which death is used as the end-point; detailed, documented scientific justification must be provided which includes evidence that alternative procedures were considered.

The CD34 stem cells will be obtained as described in a TT-IRB#2041 protocol (hematopoietic gene therapy protocol, P.I. Santolaya). Hematopoietic precursors (CD34) will be separated from cord blood using immunomagnetic kits. Briefly, blood will be collected in 10cc EDTA tubes and after removing 1cc for a CBC, the remaining volume of blood will be diluted 1:1 in PBS (Phosphate Buffered Saline) and will be centrifuged (Ficoll-Paque Plus; 1'077g/l; Pharmacia) at 1,800 rpm (value in g) for 30 minutes at 20°C, without a brake. The Ficoll-Paque is used at a 1:2 proportion with the sample. (1ml of Ficoll per 2 ml of blood). During the 30 min centrifugation a volume of MACs buffer (PBS+0.5 % BSA and EDTA 2 mM, pH 7.2) will be prepared (volume of MACS buffer will depend on sample number). After centrifugation we will collect the mononuclear cell layer, clearly demonstrated and represent as an interphase layer. The cells will be washed x2 with PBS, and centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes at 20°C. The pellet will then be re-suspended in 10 ml of MACs buffer and cells will be counted two times. Once the total number of cells is known they will be centrifuged at 1,700 rpm for 10 minutes at 4°C. After removing the supernatant 100 µl of buffer will be added for every 10^7 cells. We will then add the volume determined by the MACs KIT CD34 or CD133 Microbeads for 10^7 cells. Mix well with vortex and incubate 10 min at 4°C. Clean cells with 6-8 ml of buffer and centrifuge at 1700 rpm x 10 min at 4°C. Eliminate supernatant with a pipette and re-suspend pellet in 500 µl of de-gassed buffer. Allow for the sample to pass completely through the column and then allow 3 ml of buffer to pass. Repeat 4 times. After the 4 washes remove column from the magnet, add 3 ml of buffer and flush with the embolus. Repeat this wash once again. Since this is a process of positive selection it is the fraction that is eluted after separation from the magnet the one that contains the CD34 cells of interest. After counting we will select a sample to confirm by flow cytometry that the purity of the eluted cells is above 90%. A commercial KIT allows for the use of Mini columns (MS+ Separation Columns Ref. 422-01) or Midi (LS+ Separation Columns Ref. 424-01). The cells will be transported from Texas Tech laboratory to the Biological Resource Laboratory at University of Oklahoma in PBS medium at 4°C and will be used within a 24 hour period. Before injecting them they will be counted, assessed for viability and distributed in aliquots.

Timed pregnant baboons (*Papio anubis*) will be recruited from the breeding colony at Oklahoma University. The animals will be kept under standard care of food and water. The US-guided celocentesis procedure will be performed on all baboons between 36 and 42 days gestation. Before the procedure, 10cc of maternal peripheral venous blood sample will be obtained and an ultrasound evaluation will be performed on all animals to determine fetal viability, gestational age and visualization of the extracoelomic space. Animals will be sedated with an intramuscular injection of Ketamine (10mg/kg) and an intravenous

injection of Seratol (2 ml IV of 2.5% solution). No antibiotics or tocolysis will be used. The same sedation will be used at the time of US-guided umbilical cord sampling that will be performed at 120-140 days gestation.

For both the celocentesis and the cordocentesis procedures a transabdominal sterile technique and a 21g needle will be used. The animal's abdomen will be shaved and povidone iodine used to scrub the surface. The needle will be inserted into the extra embryonic celomic cavity under continuous Ultrasound guidance and ~3cc of extra celomic fluid will be obtained for cytological and biochemical investigations. Purified CD34 stem cells (0.5-1 cc) at 10×10^3 - 10×10^5 concentration will then be infused. The needle will then be gently withdrawn while fetal cardiac activity is visualized. Post procedure a 5cc maternal blood sample and an US evaluation will be performed. The US evaluations will be repeated on day 2 and 5 post procedure and the animal will then return to the OU corral. At 100-140 days gestation the cordocentesis will be performed as previously described and 2 cc of fetal blood obtained for analysis and 0.5-1 cc of purified CD34 stem cell (10×10^3 - 10×10^5) will then be infused. From 1995 to January 2004 the investigators have performed 13 CD34 transfusions into the baboon's extra embryonic celomic cavity at 38-42 days gestation. No maternal complications have occurred. Four fetuses delivered at term and 5 are ongoing pregnancies.

We would then like to deliver some of the fetuses via cesarean section (C/S). C/S is necessary in some animals for the following reasons: 1) it will prevent us from losing fetus at the corral since we understand that it is difficult to diagnose labor at that facility; 2) it will allow us to perform an intra-operative amniocentesis for analysis of the amniotic fluid; 3) it will allow for inspection of the placenta and to perform studies on the placenta (as you know these animals eat the placenta and cord after vaginal delivery; 4) It will allow us to collect cord blood once the fetus has delivered avoiding a neonatal blood sample. The C/S will be performed at approximately 175 days gestation. The animal will be transported to the surgery suite at BMSB and sedated with Ketamine 10mg/kg IM. Pre-emptive analgesia will be accomplished by administering buprenorphine 0.01mg/kg SQ at this time. Buprenorphine will be continued post operatively every 8 – 12 hours for 48 hours. The animal will then be intubated and placed under general anesthesia with isoflurane administered with oxygen. The skin of the ventral abdomen will be shaved and then cleansed with a minimum of 3 cycles of betadine scrub followed by 70% alcohol in preparation for a midline laparotomy. The animal will then be moved into an aseptic surgery room and placed on a heating pad. Depth of anesthesia will be monitored using jaw tone and palpebral reflex as well as pulse oximetry and blood pressure. A final prep with betadine solution will be performed in the operating room. After draping, we will perform a midline laparotomy. We will obtain an Amniotic Fluid sample before the uterine incision. The infant will be delivered via a low uterine incision and handed to Dr Wolf for drying, warming and stimulating. Mucous will be suctioned from the infant's mouth and nares as necessary and if no spontaneous breathing is seen in the first 2 minutes the infant will be intubated and ventilated. This is rarely necessary. The placenta and cord will also be delivered and cord blood collected from the portion of the cord attached to the placenta. The placenta will be placed in the appropriate sterile container. The uterus will be sutured in 2 layers using vicryl 3-0. The abdominal fascia will be closed with vicryl 1-0 followed by closure of the subcutaneous space and skin with vicryl 3-0.

Following surgery, the baboon and her infant will be placed in a cage together and allowed to recover from anesthesia. Hopefully the female will accept the infant but we will observe them for the first 4 hours for any signs of rejection and if the infant is not accepted it will be taken and hand-raised. We expect the mother and neonate to remain at the annex for at least 7 days and until they are fully recovered from Surgery. Post operative analgesia will be buprenorphine 0.01mg/kg SQ q12h for 48 hours. After 48 hours the baboon will be evaluated for pain and the buprenorphine continued as necessary. Signs of pain in the baboon are redness and swelling around the incision site, self mutilation at the site, anorexia, guarding and lethargy. The female will then go back out to Fort Reno Science Park (with or without her infant). Serial blood and or bone marrow samples (1 x month) will be obtained from the infant over the initial 6 months of life to determine for the presence of microchimerism.

PERINATAL SAMPLE COLLECTIONS

CORD BLOOD	Obtain maximum volume of cord blood at time of placenta delivery in EDTA and Heparin Tubes for CBC, PCR , Karyotype and FISH.
PLACENTA	Placenta is put in a sterile container and kept cold until arrival to Texas Tech. We will send samples for histology and we will freeze the remainder for future PCR/RT-PCR studies.
SAMPLES POST C/S	We will obtain 5cc of Maternal and Neonatal blood every 48 hours for imunological studies while human erythropoietic stem cell enhancers are administered for 5 days.

NOTE: We will test for microchimerism by PCR on the cord samples to determine peripheral blood response in each of the 2 animals that received hCD34 cells in utero. If a microchimera is detected at a molecular or cellular level we will consider administering the same hCD34 cells during the first week of life in one of the animals to see changes in immune response and engraftment over time.

NEONATAL PROTOCOL

<u>Newborn with low engraftment (A)</u>	<u>Newborn with greater engraftment (B)</u>
Regime for stimulation, proliferation and migration of stem cell with Leucomax (GM-CSF) o Neupogen (G-CSF) at a dose of 10-16 micrograms/kg/day. Single daily dose for 5 days with blood sample control every other day.	We will consider further hCD34+ lin- injections, same as administered in utero, adjusting protocol to newborn weight.
<ol style="list-style-type: none"> 1. Measure by cytometry %CD34 and level of differentiation in relationship to baboon's hCD34. 2. Use TRECS to determine Thymic maturation. 3. Neonatal injection of hCD34 to determine immunological tolerance to new transfusion cycles. 	
Once the protocol is complete we could consider crossing protocols in a manner that animal "A" goes to the hCD34 injection protocol while animal "B" goes to Stimulation protocol.	
Animal B receives growth factors	Animal A is started on injection protocol to determine the best regimen for enhancement and tolerance of the hCD34 transplants.

6. Describe the specific method for euthanasia. Identify the procedure or drug; give dosage and route of administration.

Please do not use the word "sacrifice" as a synonym for euthanasia or killed. The ILAR *Guide* states that inhalant or noninhalant chemical agents are generally preferable to physical methods of euthanasia. Please provide scientific justification when cervical dislocation or decapitation without prior anesthesia is to be the method of euthanasia.

N/A

7. Present evidence of experience and training for the conduct of animal research of the principal investigator and of other individuals who will be involved with handling of the animals. Please include the names of preceptors, sites of training and any courses taken which were related to animal experimentation or animal care.

Dr Santolaya is an Obstetrician-Geneticist that has more than 10 years experience utilizing the baboon model. He has been successful in catheterizing the umbilical vein, fetal carotid and amniotic cavity in a

chronic manner. He has also published on the non-human primate model for performing the celocentesis procedure (you have references in file from 1992, 1995, 1997, 1998, 2000, 2001, 2003).

Dr Leon Luis is an Obstetrician that has 2 years experience utilizing hematopoietic precursors from umbilical cord blood and he has also published with Dr. Santolaya in the last year.

Dr Roman Wolf is a Clinical Assistant Professor in the Division of Animal Resources, is a licensed veterinarian (OK#3575) with 18 years experience dealing with non-human primates. He has 5 years experience performing the ultrasound-guided techniques (PUBS, fetal injections) that this protocol requires.

Mr. Budy Valentine is also a certified Laboratory Animal Technician with AALAS and has 14 years of experience working with baboons, US and pre-post operative care and surgical anesthesia. He has completed the required IACUC training.

Dr Asad Sheik is Faculty at OU and Assistant Professor in the Department of Obstetrics and Gynecology, Division of Maternal Fetal Medicine. He was previously involved in animal research for 3 years at the Bowman Gray School of Medicine. Office Phone: 405-2718711 ext 48146.



The University of Oklahoma

Health Sciences Center

INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE

April 23, 2003

John Stanley, M.D./Joaquín Santolaya, M.D.
OB/GYN
WP 2430

Re: Protocol # 03-073 – Feasibility of Very Early In-Utero Gene Therapy Using Erythropoietic Stem Cells (CD34)

Dear Dr. Stanley:

Thank you for your response to the concerns on the above mentioned protocol. All concerns have been addressed adequately and the protocol received administrative approval on April 23, 2003 by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Please note that any changes to the protocol must be submitted to the IACUC prior to being implemented. Also, the addition of any new investigators or animal handlers will need to be communicated to the IACUC in the form of an addendum request.

Sincerely,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Philip A. McHale".

Philip A. McHale, Ph.D., Chairman
Institutional Animal Care and Use Committee

Cc: Asad U. Sheikh, M.D.

8.3. Técnicas de laboratorio

8.3.1. Protocolo de separación inmunomagnética de las células CD34+

MACS

Cell Isolation Kits

CD34 Progenitor Cell Isolation Kit

2 ml FcR Blocking Reagent
2 ml Hapten-Antibody
2 ml Anti-Hapten MicroBeads
For 2×10^9 total cells

Order No. 130-046-701

Overview

The CD34 Progenitor Cell Isolation Kit is an indirect magnetic labeling system for the isolation of hematopoietic progenitor cells from peripheral blood, cord blood, bone marrow or apheresis harvest by positive selection of CD34 expressing cells. With the CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, hematopoietic progenitor cells, present at a frequency of about 0.05–0.2 % in peripheral blood, 0.1–0.5 % in cord blood and 0.5–3 % in bone marrow, can be rapidly and efficiently enriched to a purity of about 85–98 %.

Research Applications of CD34 Progenitor Cells

- ▲ Characterization of hematopoietic progenitor cells and their developmental pathways.
- ▲ Studies on stimulation of proliferation and maturation by cytokines.

Isolation Strategy

The isolation of hematopoietic progenitor cells is performed by positive selection of CD34 expressing cells. Mononuclear cells from peripheral blood (PBMC), cord blood, bone marrow or apheresis harvest are obtained by density gradient centrifugation over Ficoll Paque®. Apheresis harvest can also be used as sample without density gradient centrifugation. For MACS separation, CD34⁺ hematopoietic progenitor cells are indirectly magnetically labeled using an hapten-conjugated primary monoclonal antibody and an anti-hapten antibody coupled to MACS MicroBeads. The magnetically labeled cells are enriched on Separation Columns in the magnetic field of the MiniMACS, MidiMACS, VarioMACS, SuperMACS or the autoMACS.

Components

- FcR Blocking Reagent: Human Ig.
- Hapten-Antibody: monoclonal hapten-conjugated CD34 antibody. Clone: QBEND/10. Isotype: mouse IgG1.
- Anti-Hapten MicroBeads: colloidal super-paramagnetic MACS MicroBeads conjugated to an anti-hapten antibody.

Storage

Store protected from light at 4°C. Do not freeze.

Additional Reagents Required

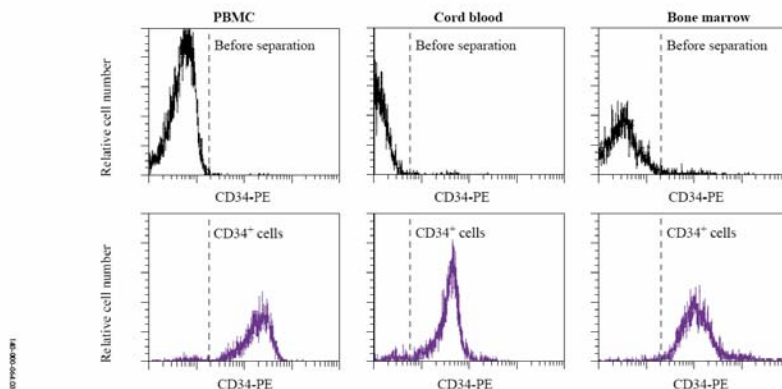
- Ficoll-Paque® and phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 2 mM EDTA or 0.6 % anticoagulants citrate dextrose-formula A (6 % ACD-A: 22.3 g/l glucose, 22 g/l sodium citrate and 8 g/l citric acid in H₂O; see "Important Notes").
- Buffer: PBS pH 7.2, supplemented with 0.5 % bovine serum albumin and 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A. Degas buffer by applying vacuum.
- (Optional) Fluorochrome conjugated CD34 antibody (e.g. CD34-FITC (AC136) # 130-081-001; CD34-PE (AC136) #130-081-002) for control of CD34 progenitor cell isolation.

Equipment Required

- Magnetic Cell Separator MiniMACS, MidiMACS, VarioMACS, SuperMACS or autoMACS.
- MS, LS or XS Column(s) (plus MS, LS or XS Column Adapter).
- Pre-Separation Filters (# 130-041-407).

Example of CD34 Progenitor Cell Isolations

Isolation of CD34⁺ cells using CD34 Progenitor Cell Isolation Kit and MiniMACS. Cells were stained with PE-conjugated CD34 (AC136) antibody.



Miltenyi Biotec

Friedrich-Ebert-Str. 68
51429 Bergisch Gladbach, Germany
Phone +49-2204-8306-0 Fax +49-2204-85197

www.miltenyibiotec.com



12740 Earhart Avenue, Auburn CA 95602, USA
Phone 800 FOR MACS, 530 888-8871
Fax 530 888-8925

page 1/4

Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

- Start with fresh human blood treated with an anticoagulant, e.g. heparin, citrate, ACD-A or citrate phosphate dextrose (CPD) or leukocyte-rich buffy coat not older than 8 hours.
- Dilute cells with 2–4 volumes of PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A.
- Carefully layer 35 ml of diluted cell suspension over 15 ml Ficoll Paque® (1.077 density) in a 50 ml conical tube and centrifuge at 400xg for 30–40 minutes at 20°C in a swinging-bucket rotor without brake.
- Aspirate the upper layer leaving the mononuclear cell layer undisturbed at the interphase.
- Carefully transfer the interphase cells (lymphocytes and monocytes) to a new 50 ml conical tube.
- Fill the conical tube with PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A, mix and centrifuge at 300xg for 10 minutes at 20°C. Carefully remove the supernatant completely.
- Resuspend the cell pellet in 50 ml of PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A and centrifuge at 200xg for 10–15 minutes at 20°C. Carefully remove the supernatant completely.
- Resuspend the cell pellet in 50 ml of buffer and centrifuge at 200xg for 10–15 minutes at 20°C. Carefully remove the supernatant completely.
- Resuspend cell pellet in a final volume of 300 µl per 10⁸ total cells (PBMC of about 100 ml blood). For less than 10⁸ total cells, use 300 µl. Proceed to magnetic labeling.

Notes

- The peripheral blood or buffy coat should not be older than 8 hours and supplemented with anticoagulants.
- PBMC may be stored in refrigerator overnight in PBS containing 0.5 % BSA supplemented with autologous serum after the last washing step.

Preparation of Cord Blood Cells

- Dilute anticoagulated cord blood 1:4 with PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A "and" carefully layer 35 ml of diluted cell suspension over 15 ml of Ficoll-Paque®.
- Centrifuge for 35 minutes at 400xg at 20°C in a swinging-bucket rotor (without brake).
- Aspirate the upper layer leaving the mononuclear cell layer undisturbed at the interphase.
- Carefully collect interphase cells and wash twice in PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A. Centrifuge for 10 minutes at 200xg at 20°C.
- Resuspend cell pellet in a final volume of 300 µl of buffer per 10⁸ total cells. For less than 10⁸ total cells, use 300 µl. Proceed to magnetic labeling.

Notes

- Do not use cord blood older than 4 hours.
- The cord blood should be drawn directly into a 50 ml tube containing 5 ml of PBS supplemented with 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A or 200 U/ml heparin.
- The cord blood should be stored at 4°C prior to separation.

Preparation of Bone Marrow Cells

- Collect bone marrow in 50 ml tubes containing 5 ml PBS supplemented with 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A or 200 U/ml heparin and store at 4°C if the cells cannot be processed immediately.
- For release of the cells, dilute in 10x excess of RPMI 1640 containing 0.02 % collagenase B and 100 U/ml DNase and shake gently at room temperature for 45 minutes.
- Pass cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filter # 130-041-407). Wet filter with buffer before use.
- Carefully layer 35 ml of diluted cell suspension over 15 ml of Ficoll-Paque®.
- Centrifuge for 35 minutes at 400xg at 20°C in a swinging-bucket rotor (without brake).
- Aspirate the upper layer leaving the mononuclear cell layer undisturbed at the interphase.
- Carefully collect interphase cells and wash twice in PBS containing 2 mM EDTA or 0.6 % ACD-A. Centrifuge for 10 minutes at 300xg at 20°C.
- Resuspend cell pellet in a final volume of 300 µl of buffer per 10⁸ total cells. For less than 10⁸ total cells use 300 µl. Proceed to magnetic labeling.

Notes

- If cells cannot be separated on the day of harvest, store cells at 4°C.
- Remove all cell clumps by passing cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filter # 130-041-407) during the cell preparation. Wet filter with buffer before use.

Preparation of Cells from Leukapheresis Material

- Filter through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filter # 130-041-407), in order to remove clumps, wash cells once with buffer and resuspend in a final volume of 300 µl of buffer per 10⁸ cells. For less than 10⁸ total cells, use 300 µl. Proceed to magnetic labeling.

Magnetic Labeling of CD34⁺ Progenitor Cells

- Add 100 µl **FcR Blocking Reagent** per 10⁸ total cells and mix well. Add 100 µl **Hapten-Antibody** per 10⁸ total cells, again mix well and incubate for 15 minutes at 6°–12°C. The final labeling volume is 500 µl per 10⁸ total cells.
- Wash cells carefully with buffer by adding 10–20x the staining volume (5–10 ml per 10⁸ total cells), centrifuge and remove supernatant completely. Resuspend cell pellet carefully and fill up with buffer to a final volume of 400 µl per 10⁸ total cells.
- Add 100 µl **Anti-Hapten MicroBeads** per 10⁸ total cells (final labeling volume of 500 µl per 10⁸ total cells), mix well and incubate for 15 minutes at 6°–12°C.
- (Optional) Perform fluorescent staining of CD34⁺ cells (see paragraph "Evaluation of CD34⁺ Cell Purity (optional)").
- Wash cells and resuspend cell pellet in 500 µl buffer per 10⁸ total cells.

Magnetic Separation of < 2 x 10⁹ Mononuclear Cells

- Choose a MS or a LS Column according to the number of total unseparated cells and place it (with Column Adapter) in the magnetic field of the MACS separator. Fill and rinse with buffer (MS: 500 µl; LS: 3 ml; for details, see "Column Data Sheets").
- Pass cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filter # 130-041-407) to remove clumps. Wet filter with buffer before use.
- Apply cells to the column, allow cells to pass through the column and wash with buffer (MS: 3 x 500 µl; LS: 3 x 3 ml).
- Remove column from separator, place column on a suitable tube, pipette buffer on top of column (MS: 1 ml; LS: 5 ml) and elute retained cells using the plunger supplied with the column.
- Repeat magnetic separation step: apply the eluted cells to a new prefilled MS Column for <10⁷ CD34⁺ cells or to a new prefilled LS Column for <10⁸ CD34⁺ cells. Wash, and elute retained cells in buffer (MS: 500 µl; LS: 2.5 ml).

Magnetic Separation of 2 x 10⁹ – 2 x 10¹⁰ Mononuclear Cells

- Assemble a XS Column and place it in the column holder of the SuperMACS using a XS Column Adapter (for details, see "XS Separation Columns Data Sheet").
- Turn 3-way-stopcock to position "fill".
- Fill the column from the bottom with buffer from the syringe until the buffer reaches the syringe cylinder.
- Turn the 3-way-stopcock to position "run" and rinse column by filling from the top with buffer. Allow buffer to run into the column. Then add more buffer. Rinse with 50 ml of buffer.
- Close 3-way-stopcock; leave the syringe attached during separation, except when refilling with buffer.
- Move column in the magnetic field of the SuperMACS by turning the handle.
- Pass cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filter # 130-041-407) to remove cell clumps.

- Apply cells into the syringe cylinder that is set up on the XS Column and turn 3-way-stopcock to position "run". Allow the cells to pass through the column.
- Remove flow resistor and wash with 4 x 30 ml buffer.
- Close 3-way-stopcock and remove column out of the magnetic field of the SuperMACS by turning the XS Adapter handle backward (see "XS Separation Columns Data Sheet").
- Detach syringe from the 3-way-stopcock, fill with buffer and attach to port A of the XS Column.
- Elute retained cells with 20 ml buffer using the syringe.
- Repeat magnetic separation step: apply the eluted cells to a new prefilled XS Column, wash, and elute retained cells in buffer.

Magnetic Separation with autoMACS

Positive selection or depletion for up to 4 x 10⁹ total cells (2 x 10⁸ positive cells) can be achieved by using autoMACS.

For standard positive selection of CD34⁺ cells from **peripheral blood, bone marrow or leukapheresis** it is recommended to use the program "posseld".

For isolation of CD34⁺ cells from cord blood it is advised to use the program "posseld2".

Evaluation of CD34⁺ Cell Purity (optional)

- The purity of the isolated hematopoietic progenitor cells can be evaluated by flow cytometry or microscopy.

● Fluorescent staining of CD34⁺ cells can be accomplished by different methods: CD34⁺ cells can be fluorescently labeled using either a fluorochrome conjugated primary antibody or a fluorochrome conjugated second step antibody (e.g. rat anti-mouse IgG1-FITC). Using a primary antibody, choose an antibody (e.g. clone AC136) recognizing an epitope different from that recognized by the CD34 monoclonal antibody QBEND/10.

- Fluorescent staining can be performed immediately after magnetic labeling and before MACS separation. Add 50 µl of CD34-PE (# 130-081-002) or 50 µl of CD34-FITC (# 130-081-001) per 10⁸ cells resuspended in 500 µl buffer. For less than 10⁸ cells also add 50 µl. Incubate for 5–10 min in the dark at 6–12°C.

- After fluorescence staining, cells should be washed and resuspended in buffer.

Important Notes

- ▲ Avoid capping of antibodies on the cell surface during labeling by working fast, and keeping cells cold. Use cold solutions only. **Attention:** Working on ice requires increased incubation times for **Anti-Hapten MicroBeads**. Incubate at 6°–12°C.
- ▲ Increased temperature and prolonged incubation time for labeling may lead to unspecific cell labeling.
- ▲ Wash cells carefully and remove buffer completely from cell pellet after incubation with **FcR Blocking Reagent** and **Hapten-Antibody**.
- ▲ If progenitor cells are taken into culture, EDTA in the buffer may have a slightly negative effect. EDTA can be replaced by other supplements such as 0.6 % ACD-A or citrate phosphate dextrose (CPD).

130-046-701

Miltenyi Biotec

www.miltenyibiotec.com 

This **MACS** product is for *in vitro* research use only and not for diagnostic or therapeutic procedures.

page 3/4

- ▲ Use degassed buffer only! Excess of gas in buffer will form bubbles in the matrix of the column during separation. This may lead to clogging of the column and decreases the quality of separation.
- ▲ Contamination of the cell preparation with excessive number of thrombocytes can result in low purities and can also cause cell clumping which may clog the column. Additional washes after density gradient centrifugation over Ficoll Paque® at 200xg for 10 minutes will reduce the number of thrombocytes in the cell preparation.

MACS References

1. Choi, ES; Nichol, JL; Hokom, MM; Hornkohl, AC; Hunt, P (1995) Platelets Generated In Vitro From Proplatelet-Displaying Human Megakaryocytes Are Functional. *Blood* 85: 402-413. [24]
2. Bautz, F; Rafii, S; Kanz, L; Möhle, R (2000). Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells: Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp. Hematol.* 28: 700-706. [961]
3. de Wynter, EA; Coutinho, LH; Pei, X; Marsh, JCW; Hows, J; Luft, T; Testa, NGF (1995) Comparison of Purity and Enrichment of CD34⁺ Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord and Peripheral Blood (Primed for Apheresis) Using Five Separation Systems. *Stem Cells* 13: 524-532. [144]
4. Fehse, B; Uhde, A; Fehse, N; Eckert, HG; Clausen, J; Rüger, R; Koch, S; Ostertag, W; Zander, A; Stockschräger, M (1997). Selective Immunoaffinity-Based Enrichment of CD34⁺ Cells Transduced with Retroviral Vectors Containing an Intracytoplasmatically Truncated Version of the Human Nerve-Growth Factor Receptor (DLNGFR) Gene. *Hum. Gene Ther.* 8: 1815-1824. [365]
5. Nicol, A; Nieda, M; Donaldson, C; Denning-Kendall, P; Bradley, B; Hows, J (1995) Analysis of Cord Blood CD34 Cells Purified After Cryopreservation. *Exp. Hematology* 23: 1589-1549. [173]
6. Siena, S; DiNicola, M; Bregni, M; Mortarini, R; Anichini, A; Lombardi, L; Ravagnani, F; Parmiani, G; Gianni, AM (1995) Massive Ex Vivo Generation of Functional Dendritic Cells from Mobilized CD34⁺ Blood Progenitors for Anticancer Therapy. *Exp. Hematology* 23: 1465-1473. [153]
7. Thiele, J; Wickenhauser, C; Baldus, SE; Kuemmel, T; Zirbes, TK; Drebber, U; Wirtz, R; Thiel, A; Hansmann, ML (1995) Characterization of CD34⁺ Human Hematopoietic Progenitor Cells from the Peripheral Blood: Enzyme-, Carbohydrate- and Immunocytochemistry, Morphometry, and Ultrastructure. *Leuk. Lymph.* 16: 483-491. [143]
8. Ye, Z; Gee, AP; Bowers, WE; Lamb, LS; Turner, MW; Henslee-Downey, PJ (1996) In Vitro Expansion and Characterization of Dendritic Cells Derived from Bone Marrow CD34⁺ Cells. *Bone Marrow Transplant.* 18: 997-1008. [155]
9. Yin, AH; Miraglia, S; Zanjani, ED; Almeida-Porada, G; Ogawa, M; Leary, AG; Olweus, J; Kearney, J; Buck, DW. (1997). AC133, A Novel Marker For Human Hematopoietic Stem And Progenitor Cells. *Blood* 90: 5002-5012. [383]

Warning

Reagents contain sodium azide. Sodium azide yields hydrazoic acid under acid conditions, which is extremely toxic. Azide compounds should be diluted with running water before discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in plumbing where explosive conditions may develop.

Warranty

The products sold hereunder are warranted only to be free from defects in workmanship and material at the time of delivery to the customer. MILTENYI BIOTEC GmbH makes no warranty or representation, either expressed or implied, with respect to the fitness of a product for a particular purpose. There are no warranties, expressed or implied, which extend beyond the Technical Specifications of the products. MILTENYI BIOTEC GmbH's liability is limited to either replacement of the products or refund of the purchase price. MILTENYI BIOTEC GmbH is not liable for any property damage, personal injury or economic loss caused by the product.

Ficoll-Paque® is a trademark of Pharmacia.

130-045-701

Miltenyi Biotec

www.miltenyibiotec.com



This **MACS** product is for *in vitro* research use only and not for diagnostic or therapeutic procedures.

page 4/4

8.3.2. Protocolo de separación inmunomagnética de las células CD3+

MACS

Magnetic Cell Sorting of
Human Leukocytes

CD3 MicroBeads

2 ml CD3 MicroBeads
For 10^9 total cells

Order No. 130-050-101

Contents

MACS colloidal super-paramagnetic MicroBeads conjugated with monoclonal mouse anti-human CD3 antibodies.

Isotype: mouse IgG2a.

The product is supplied as suspension containing 0.1 % BSA and 0.05 % sodium azide.

Applications

CD3 MicroBeads were developed for separation of human cells based on the expression of the CD3 antigen. CD3 is expressed on T cells.

- ▲ Positive selection or depletion of cells expressing human CD3 antigen.
- ▲ Isolation or depletion of T cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), body fluids (e.g. bronchial lavage) or any tissue (e.g. lymphoid and tumor tissue).

Principle of MACS Separation

For MACS separation, cells are magnetically labeled with CD3 MicroBeads and separated on a column which is placed in the magnetic field of a MACS separator. The magnetically labeled CD3⁺ cells are retained in the column while the unlabeled CD3⁻ cells run through. The unlabeled cells are depleted of CD3⁺ cells. After removal of the column from the magnetic field, the magnetically retained CD3⁺ cells can be eluted as positively selected cell fraction.

How to Use MACS CD3 MicroBeads

CD3⁺ cells can be enriched from peripheral blood, body fluids such as bronchial lavage and any tissue using positive selection columns (MS⁺/RS⁺ or LS⁺/VS⁺). CD3 MicroBeads can be used for depletion of CD3⁺ cells on depletion columns (AS, BS, CS or D). Cells which strongly express CD3 antigen can also be depleted using positive selection columns (MS⁺/RS⁺ or LS⁺/VS⁺).

Instrument and Reagent Requirement

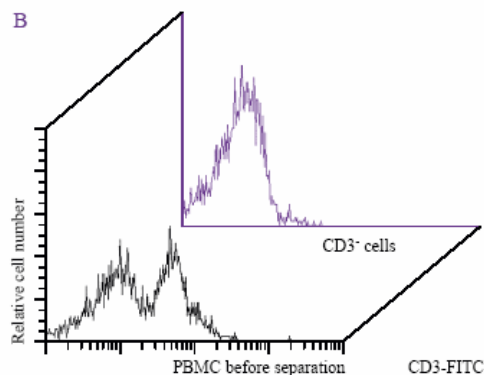
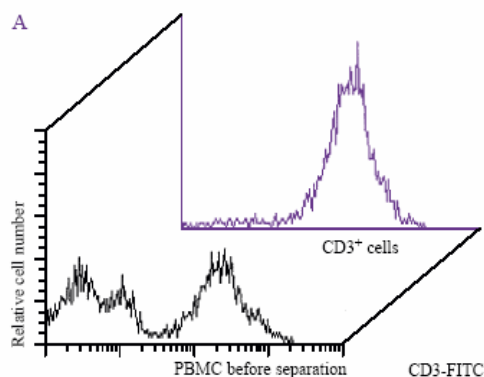
Magnetic cell separators MiniMACS, MidiMACS, VarioMACS or SuperMACS; positive selection column(s) or depletion column(s). Buffer: phosphate buffered saline pH 7.2, supplemented with 0.5 % bovine serum albumin and 2 mM EDTA (see "Important Notes"). (Optional) Fluorochrome conjugated CD3 antibody (CD3-FITC Order No. 130-080-401).

Storage of MACS MicroBeads

Store protected from light at 4°C. Do not freeze.

Example for a Separation Using MACS CD3 MicroBeads

Separation of PBMC using MACS CD3 MicroBeads and MiniMACS with positive selection column type MS⁺ (A) or VarioMACS with depletion column type AS (B). Cells are fluorescently stained with CD3-FITC.



130-050-101

Miltenyi Biotec

Friedrich-Ebert-Strasse 58,
51429 Bergisch Gladbach, Germany
Phone 02204-8306-0 FAX 02204-86197

www.miltenyibiotec.com



12740 Earhart Avenue, Auburn CA 95602, USA
Phone 800 FOR MACS, 530 888-8871
Fax 530 888-8926

page 1/2

Protocol for Magnetic Labeling of Cells with CD3 MicroBeads

- Isolate PBMC from anti-coagulated human blood or buffy coat or isolate single cell suspension from body fluids such as bronchial lavage or any tissue by standard preparation method. For the isolation of PBMC and to remove dead cells, we recommend density gradient centrifugation using Ficoll-Paque®. To remove clumps, pass cells through 30 µm nylon mesh or filter (Order No. 130-041-407).
- Wash cells, remove supernatant completely and resuspend cell pellet in 80 µl of buffer per 10⁷ total cells.
- Add 20 µl of MACS CD3 MicroBeads per 10⁷ total cells, mix well and incubate for 15 minutes at 6°–12°C.
- (Optional) Add fluorochrome conjugated CD3 antibody at the titer recommended by the manufacturer and incubate for additional 5–10 minutes.
- Wash cells by adding 10–20x the labeling volume of buffer, centrifuge at 300xg for 10 minutes, remove supernatant completely and resuspend cell pellet in appropriate amount of buffer (500 µl of buffer per 10⁸ total cells). Proceed to magnetic separation.

Magnetic Separation with Positive Selection Columns (Protocol for 10⁴–10⁸ Positive Cells)

- Choose a positive selection column type MS⁺/RS⁺ (for up to 10⁷ positive cells), or LS⁺/VS⁺ (for up to 10⁸ positive cells) and place the column in the magnetic field of an appropriate MACS separator (see "Column Data Sheets").
- Prepare column by washing with appropriate amount of buffer (MS⁺/RS⁺: 500 µl, LS⁺/VS⁺: 3 ml; for details, see "Column Data Sheets").
- Apply cell suspension in appropriate amount of buffer onto the column (MS⁺/RS⁺: 500 µl, LS⁺/VS⁺: 1–10 ml). Let the negative cells pass through. Rinse with appropriate amount of buffer (MS⁺/RS⁺: 3 x 500 µl, LS⁺/VS⁺: 3 x 3 ml).
- Remove column from separator, place column on a suitable collection tube, pipette appropriate amount of buffer (MS⁺/RS⁺: 1 ml; LS⁺/VS⁺: 5 ml) onto the column and firmly flush out positive cells using the plunger supplied with the column.

Magnetic Separation with Depletion Columns (Protocol for 10⁴–2x10⁸ Positive Cells)

- Choose a depletion column type AS (for up to 3x10⁷ positive cells), BS (for up to 10⁸ positive cells) or CS (for up to 2x10⁸ positive cells), assemble the column and place it in the magnetic field of an appropriate MACS separator (see "Column Data Sheet").
- Prepare column by filling and washing with appropriate amount of buffer. Attach a flow resistor to the 3-way-stopcock of the assembled column (AS: 25G, BS: 23G, CS: 22G; for details, see "Column Data Sheet").
- Apply cell suspension in appropriate amount of buffer on top of the depletion column (AS: 500 µl, BS: 1 ml, CS: 2 ml)

- Let the negative cells pass through. Rinse with 3–5 column volumes of buffer from top (AS: 3 ml; BS: 15 ml; CS: 30 ml). Collect effluent as negative fraction.

Magnetic Separation with Depletion Column Type D (Protocol for up to 10⁹ Positive Cells)

- Assemble the column type D and place it in the magnetic field of SuperMACS (see "Column Data Sheet").
- Prepare column by filling with 70 % ethanol and rinsing with 200 ml of buffer. Attach a flow resistor (21G) to the 3-way-stopcock of the column (for details, see "Column Data Sheet").
- Apply cells resuspended in 10 ml of buffer on top of the depletion column.
- Let the negative cells pass through. Wash with 3–5 column volumes (150–200 ml) of buffer from top. Collect effluent as negative fraction.

Important Notes

- ▲ Avoid capping of antibodies on the cell surface during staining. Work fast, keep cells cold, use cold solutions only. **Attention:** Working on ice requires increased incubation times for MACS MicroBeads. Incubate in refrigerator at 6°–12°C.
- ▲ EDTA in the buffer can be replaced by other supplements such as acid citrate dextrose (ACD-A) or citrate phosphate dextrose (CPD). BSA can be replaced by other proteins such as gelatin, HSA or FCS. Buffers or media containing Ca²⁺ or Mg²⁺ are not recommended for use.
- ▲ Higher temperatures and longer incubation times for staining and magnetic labeling may lead to unspecific cell labeling.
- ▲ MACS MicroBeads may bind unspecifically to dead cells. Therefore, dead cells should be removed before labeling, e.g. by Ficoll-Paque® density gradient centrifugation.
- ▲ Large numbers of cells in the starting sample require a larger buffer volume when applying cells onto separation column. Use a maximum cell concentration of 10⁸ cells per 500 µl of buffer.
- ▲ Increased MACS CD3 MicroBead concentrations may impair antibody fluorochrome staining when using antibody of the same specificity.

Warning

Reagents contain sodium azide. Sodium azide yields hydrazoic acid under acid conditions, which is extremely toxic. Azide compounds should be diluted with running water before discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in plumbing where explosive conditions may develop.

Warranty

The products sold hereunder are warranted only to be free from defects in workmanship and material at the time of delivery to the customer. MILTENYI BIOTEC GmbH makes no warranty or representation, either expressed or implied, with respect to the fitness of a product for a particular purpose. There are no warranties, expressed or implied, which extend beyond the Technical Specifications of the products. MILTENYI BIOTEC GmbH's liability is limited to either replacement of the products or refund of the purchase price. MILTENYI BIOTEC GmbH is not liable for any property damage, personal injury or economic loss caused by the product.

Ficoll-Paque® is a trademark of Pharmacia.

1305000001

8.3.3. Protocolo de extracción del DNA a partir de sangre total.

PUREGENE®

PUREGENE® DNA Purification Kit

DNA Purification Protocol For 1 ml Whole Blood

Expected Yield Range 15-45 µg DNA

Cell Lysis

1. Add 1 ml whole blood (or bone marrow) to a 15 ml tube containing 3 ml **RBC Lysis Solution**. Invert to mix and incubate 5 minutes at room temperature. Invert again at least once during the incubation.
2. Centrifuge at 2,000 x g for 5 minutes. Remove supernatant leaving behind the white cell pellet and about 100 µl of the residual liquid.
3. Vortex the tube vigorously to resuspend the cells in the residual liquid. This greatly facilitates cell lysis in Step 4 below.
4. Add 1 ml **Cell Lysis Solution** to the resuspended cells and pipet up and down to lyse the cells. Usually no incubation is required; however, if cell clumps are visible after mixing, incubate at 37°C or room temperature until the solution is homogeneous. Samples are stable in **Cell Lysis Solution** for at least 2 years at room temperature.

RNase Treatment (Optional)

1. Add 5 µl **RNase A Solution** to the cell lysate.
2. Mix the sample by inverting the tube 25 times and incubate at 37°C for 15 minutes.

Protein Precipitation


1. Cool sample to room temperature.
2. Add 333 µl **Protein Precipitation Solution** to the cell lysate.
3. Vortex vigorously at high speed for 20 seconds to mix the **Protein Precipitation Solution** uniformly with the cell lysate.
4. Centrifuge at 2,000 x g for 5 minutes. The precipitated proteins will form a tight dark brown pellet. If the protein pellet is not tight, repeat Step 3 followed by incubation on ice for 5 minutes and then repeat Step 4.

DNA Precipitation

1. Pour the supernatant containing the DNA (leaving behind the precipitated protein pellet) into a 15 ml tube containing 1 ml **100% Isopropanol** (2-propanol).
2. Mix the sample by inverting gently 50 times.
3. Centrifuge at 2,000 x g for 3 minutes; the DNA will be visible as a small white pellet.
4. Pour off supernatant and drain tube briefly on clean absorbent paper. Add 1 ml **70% Ethanol** and invert the tube several times to wash the DNA pellet.
5. Centrifuge at 2,000 x g for 1 minute. Carefully pour off the ethanol. *Pellet may be loose so pour slowly and watch pellet.*
6. Invert and drain the tube on clean absorbent paper and allow to air dry 10-15 minutes.

DNA Hydration

1. Add 100 µl **DNA Hydration Solution** (100 µl will give a concentration of 300 µg/ml if the total yield is 30 µg DNA).
2. Rehydrate DNA by incubating at 65°C for 1 hour and overnight at room temperature. If possible, tap tube periodically to aid in dispersing the DNA.
3. For storage, sample may be centrifuged briefly and then transferred to a 1.5 ml microfuge tube. Store DNA at 4°C. For long-term storage, store at -20°C or -80°C.



© Copyright 2003 Gentra Systems, Inc. Printed in USA • 3/03 • 00000 Rev B

13355 10th Avenue North • Suite 120 • Minneapolis, Minnesota 55441
 ph. (763) 543-0678 • USA (800) 866-3039 • fax (763) 543-0699 • www.gentra.com

8.4. Producción bibliográfica en relación con la presente memoria.

1. BECAS Y PREMIOS

2003: Premio Anual de la *Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Madrid*, al mejor trabajo original. Título: “Desarrollo embriológico y dinámica de las moléculas entre el suero materno y las estructuras extraembrionarias.” Noviembre, 2003.

2004: Premio 12th Annual *Texas Resident Research Day*. 2º puesto al mejor trabajo de investigación. “Feasibility of very early in-utero gene therapy using eritropoietic stem cell”. Abril, 2004, Dallas, Texas. EE.UU.

2. PUBLICACIONES CIENTIFICAS (INTERNACIONALES)

1. Joaquin Santolaya Forgas, Juan De León Luis, Roberto Levy D’Ancona, Jeffrey Morgan, Rober Kauffman. Evolution of the Amniotic Sac and Extracelomic Space as Seen by Early Ultrasound Examination. ***Fetal Diagnosis and Therapy***. 2003;18:262-268.
2. Juan De León , George Sifuentes, Cullen Hopkins, Vivian Noble, Terry Gimpel, Thomas Myles and Joaquin Santolaya-Forgas, Maternal serum free B-hCG levels in uncomplicated pregnancies at 10⁺¹ and 14⁺⁶ gestation and the development of obstetrical complications. ***Journal of Reproductive Medicine***. 2004;49: 89-92
3. J.A. De Leon M.D., J. Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D. Insulin like growth factor regulatory system for Obstetrician and gynecologist. ***Fetal Diagnosis and Therapy*** (Aceptado Diciembre 2003)
4. J.A. De Leon-Luis, R.H. Oneson_and J. Santolaya-Forgas. Placental surface cyst less echogenic than amniotic fluid on second trimester ultrasonographic evaluation. ***Ultrasound in Obstetric and Gynecology*** (Aceptado Marzo 2004).
5. Santolaya-Forgas J., De Leon-Luis J., Hewitt T., Shen Z., McCorquodale J., McCorquodale M. Chromosomal studies at 5 weeks post fertilization via celocentesis in the time-pregnant baboon model. ***American Journal of Medical Genetics***. (Submitted march 2004).

6. Juan De Leon-Luis M.D., Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D. Biochemical composition of the extra-embryonic celomic fluid: a catalog based on percentage differences with maternal serum paired samples. ***Obstetrics and Gynecology***. (Submitted march 2004).
7. Santolaya-Forgas J., De Leon-Luis J. and Terry Hewitt. Treatment with morphine sulfate can reduce maternal plasma oxytocin levels and uterine contractions after open fetal surgery. ***American Journal of Obstetrics and Gynecology***. (Submitted april 2004).
8. Juan De Leon-Luis M.D., Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D. Ultrasonographic development of human and baboon pregnancies matched by Carnegie Stages of development: validation of the time-pregnant baboon model for *in utero* gene therapy in the pre-immune embryo. ***Ultrasound in Obstetric and Gynecology*** (Submitted april 2004).

3. PUBLICACIONES CIENTIFICAS (NACIONALES)

4. Juan De León Luis y Joaquín Santolaya-Fórgas. El saco vitelino y su contribución al desarrollo del saco amniótico antes de las seis semanas de gestación: a propósito de un caso de aborto retenido. ***Progresos en Obstetricia y Ginecología***. 2003;46(12):568-70
5. J.A De León Luis, I. Galán, M^a A. Muñoz-Fernández, L Ortiz , J.A. Clavero Núñez y Joaquín Santolaya-Forgas. Actividad Biológica de los compartimentos extraembrionarios. ***Progresos en Obstetricia y Ginecología***. (aceptado para publicación febrero 2004).



SOCIEDAD DE
GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
DE MADRID
C/ Villanueva, 11, 3º, 28021-MADRID

Con fecha 29 de octubre de 2003, reunida la Junta Directiva de la Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Madrid, bajo la presidencia del Prof. Dr. D. José Antonio Clavero Núñez acuerdan por unanimidad el conceder al trabajo titulado "DESARROLLO EMBRIOLÓGICO Y DINÁMICA DE MOLÉCULAS ENTRE EL SUERO MATERNO Y LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBIONARIAS" realizado por los Doctores:

- Dr. D. José Antonio León Luis
- Dra. D^a M^a Ángeles Muñoz Fernández
- Dr. D. Joaquín Santolaya Fórgas

el premio extraordinario al mejor trabajo inédito presentado en el concurso que anualmente convoca nuestra sociedad.

Madrid, cinco de noviembre de dos mil tres.

Fdo.: Prof. Dr. D. J.A. Clavero Núñez
Presidente

Fdo.: Prof. Dr. D. Luis Ortiz Quintana
Vicepresidente

Fdo.: Dr. D. Francisco Vicandi Plaza
Secretario



Evolution of the Amniotic Sac and Extracelomic Space as Seen by Early Ultrasound Examination

Joaquin Santolaya-Forgas Juan De Leon-Luis Roberto Levy D'Ancona
Jeffrey Morgan Robert P. Kauffman

Department of Obstetrics and Gynecology, Texas Tech University and Health Science Center at Amarillo,
Amarillo, Tex., USA

Key Words

Ultrasound • Amniotic sac • Extracelomic space • First trimester pregnancy

Abstract

Objective: Amniotic sac and extracelomic space changes occurring from 5 to 14 weeks of pregnancy were observed with transvaginal ultrasound to gain new insights into their normal relationships during this time period. **Study Design:** Ninety-seven women from 5 to 15 weeks' gestation were enrolled in the study. Gestational age was determined by measuring embryonic crown-rump length. The embryo, amniotic sac, and gestational sac areas were measured using the best-fitted computer-generated elliptical view. The embryonic heart rate was measured using the M-mode function of the ultrasound equipment. Associations were determined using the least-squares method and Pearson's correlation coefficient. **Results:** Mean (range) gestational age calculated from CRL was 9.6 (5.3–14.6) weeks, embryonic heart rate 153 (100–188) beats per minute, embryonic surface 699.6 (5–2,199) mm², amniotic sac surface 1,383 (5–5,335) mm² and gestational sac surface was 1,517 (110–5,335) mm². Significant correlations between gestational sac surface, amniotic sac surface, embryonic surface, heart rate and gestational age were noted ($p < 0.01$). Changes in the

amniotic sac surface correlated with embryonic surface but not with heart rate even when multiple regression analysis was attempted. **Conclusion:** These data describe the normal relationships between the embryonic, amniotic sac, extracelomic space, and gestational sac surface, suggesting that increases in embryonic surface area is a determining factor for early expansion of the amniotic sac at these gestational ages.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

Introduction

The presence of the gestational sac, yolk sac and cardiac activity are most likely the first unequivocal sonographic evidences of a true gestation. Transvaginal sonography (TVS) allows visualization of the anatomical changes occurring from the early follicular phase to the end of the first trimester of pregnancy [1–8]. TVS has been used to assess the implantation site, the number of embryos, their morphology, and the expected date of delivery. Several authors have also used TVS to assess the quality of the pregnancy: Goldstein [9] reported that in the presence of a gestational sac, subsequent loss of viability in the embryonic period is about 11%; pregnancy loss rates are 8.5% with a secondary yolk sac and 3.3% once an embryo of 6–10 mm is visualized. Other authors have

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel
1015–3837/03/0184–0262\$19.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/ftd

Joaquin Santolaya-Forgas, MD, PhD, Division of Reproductive Genetics
Fetal Medicine and Ultrasound, Department of Obstetrics and Gynecology
Texas Tech University and Health Science Center at Amarillo, 1400 Coulter
Amarillo, TX 79106 (USA)
Tel. +1 806 354 5570, Fax +1 806 354 5516, E-Mail jsf@ama.ttuhsu.edu

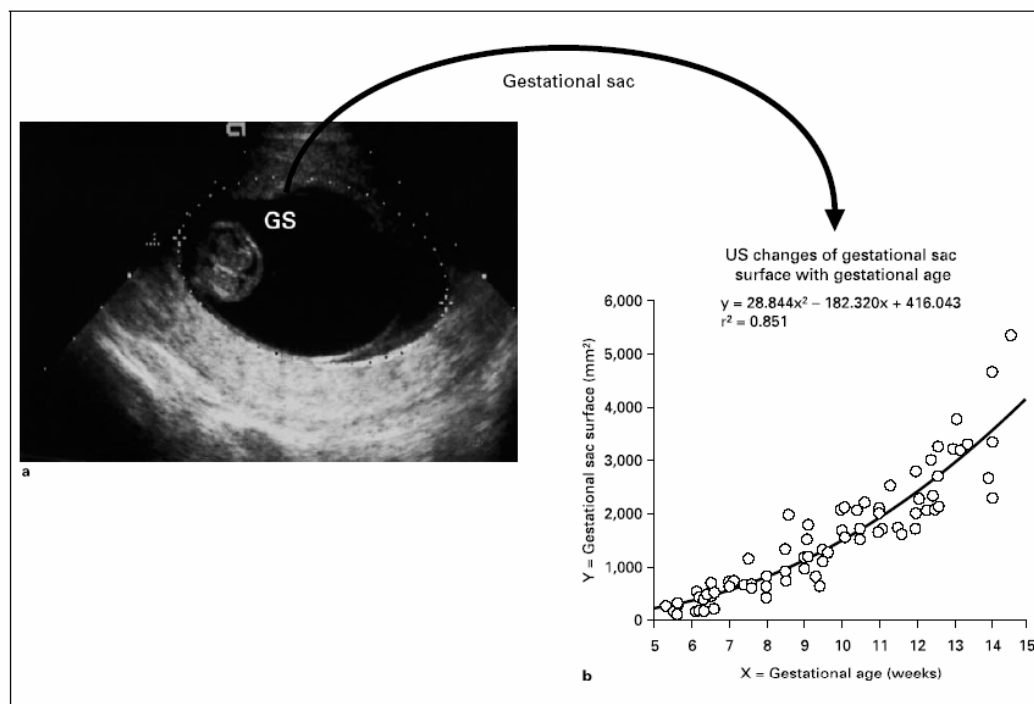


Fig. 1. a Gestational sac by transvaginal sonography. b Changes of gestational sac maximal area with gestational age ($p < 0.01$).

reported that when the secondary yolk sac cannot be seen ultrasonographically by the 6th week of pregnancy the prognosis is poor [3]. Documentation of embryonic heart activity has also been used for counseling about the prognosis of the pregnancy, and when activity is seen, the abortion rate is less than 5% in women younger than 36 years of age and approximately 18% in women older than 35 years of age [3, 10, 11]. Finally, the ultrasonographic observations of abnormal development of extra-embryonic membranes and embryonic cardiac pump function have also been related to abnormal pregnancy outcome and embryonic demise [8, 10–15]. In spite of having all of this clinical information, currently there is very limited data concerning the normal amniotic sac (AS) expansion early in pregnancy. Furthermore, very little is known about the mechanism by which the AS expands early in pregnancy. The noninvasive nature of ultrasound may prove to be the best technique available for the in vivo

assessment and evaluation of determinants and rate of amniotic fluid accumulation early in human pregnancies.

Our aim was to gain further insight into the normal relationships among the extraembryonic structures early in pregnancy and to assess the possible role of embryonic heart rate and surface area on early accumulation of amniotic fluid. For this purpose, we have evaluated the TVS changes occurring from weeks 5 to 14 of pregnancy. We measured the embryonic crown rump length (CRL), heart rate (EHR), and areas of the embryo (EA), amniotic sac (AS), and gestational sac (GS).

Materials and Methods

Ninety-seven women with singleton pregnancies between 5 and 15 weeks referred for a dating ultrasound were studied. After informed consent was obtained for participation in the study, all women had a TVS examination with the spatial peak temporal aver-

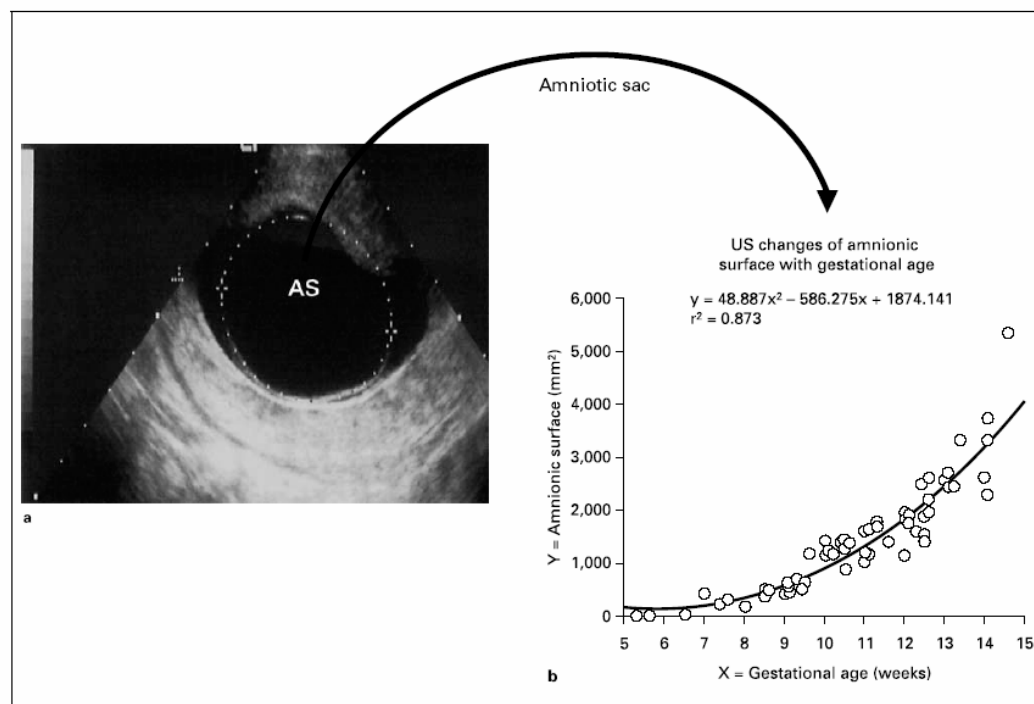


Fig. 2. **a** Amniotic sac by transvaginal sonography. **b** Changes of amniotic sac maximal area with gestational age ($p < 0.01$).

age intensities of less than 100 mW/cm² (Acuson 128XP: 7.5 MHz transducer; ATL 3,500: 6.5-MHz transducer). The sonographic examination lasted approximately 5 min. For the purpose of this study, we included cases in which we could confirm cardiac activity and that had no clinical symptoms of pathology. Patients with uterine anomalies or myomas that might deform the shape of the gestational sac and one ectopic pregnancy were excluded from analysis. Areas were determined using the best-fitted computer generated elliptical view. M-Mode ultrasound was used to determine heart rates. Permanent pictures were obtained from all CRL, EHR, EA, AS, and GS measurements for later analysis by one author (J.S.-F.) who selected only those which demonstrated excellent quality and elliptical fits for final computation (fig. 1–4). Gestational age was calculated from CRL measurements according to machine-incorporated nomograms [16]. Minitab statistical analysis package was used for computing summary statistics, plots of data, and measurements of associations between variables. Associations were determined using the least-squares method and Pearson's correlation coefficient.

Results

The mean gestational age calculated from CRL was 9.6 weeks ($n = 97$; range 5.3–14.6), CRL 32.5 mm ($n = 97$; range 1.9–88.6), ES 699.6 mm² ($n = 56$; range 5–2,199), AS 1,383 mm² ($n = 64$; range 5–5,335), GS 1,517 mm² ($n = 84$; range 110–5,335), and EHR 153 beats per minute ($n = 85$; range 100–188). Table 1 demonstrates number and mean (SD) values of study parameters at different gestational age periods.

Statistically significant correlations ($p < 0.01$) were noted between ES, AS, GS and gestational age (fig. 1–3). A weaker but significant second-degree correlation was also found between presence of EHR and gestational age (fig. 4). The AS correlated with ES ($p < 0.001$) but not with EHR ($p = 0.798$) (fig. 5a, b).

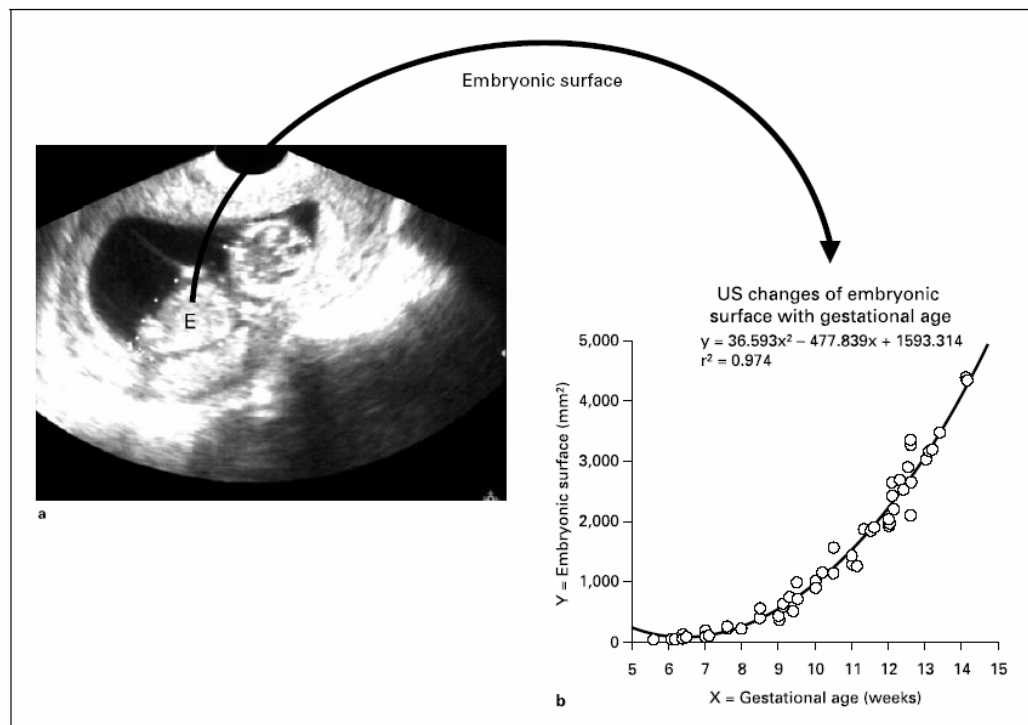


Fig. 3. **a** Embryonic surface by transvaginal sonography. **b** Changes of embryonic maximal area with gestational age ($p < 0.01$).

Table 1. Changes occurring during early gestation as seen by ultrasound

Weeks	n	Embryo area	Amnion area	% AF	GS area	ECS %	EHR
5-5.6	6	-	10 (7)	-	227 (87)	95	120 (29)
6-6.6	14	28 (18)	28 (18)	-	384 (167)	92	132 (16)
7-7.6	9	78 (37)	336 (89)	77	730 (178)	54	145 (17)
8-8.6	8	173 (74)	330 (7)	48	928 (505)	64	158 (8)
9-9.6	13	305 (98)	609 (211)	50	1,122 (362)	66	171 (6)
10-10.6	13	557 (122)	1,277 (179)	56	1,873 (267)	32	165 (16)
11-11.6	9	801 (154)	1,450 (273)	45	1,899 (325)	24	159 (7)
12-12.6	15	1,257 (233)	1,881 (403)	33	2,382 (411)	20	159 (10)
13-13.6	5	1,609 (93)	2,703 (350)	40	3,361 (269)	20	154 (9)
14-14.6	5	2,187 (17)	3,468 (1,183)	37	3,655 (1,303)	5	158 (13)

Weeks of gestational age estimated from CRL. n = Number of patients. Values expressed as mean and SD (area = mm²). EHR = Embryonic heart rate (beats per minute); GS = gestational sac area; %AF = percentage of amniotic sac not occupied by the embryo; ECS = extracelomic space; ECS% = percentage of the gestational sac not occupied by the amniotic sac.

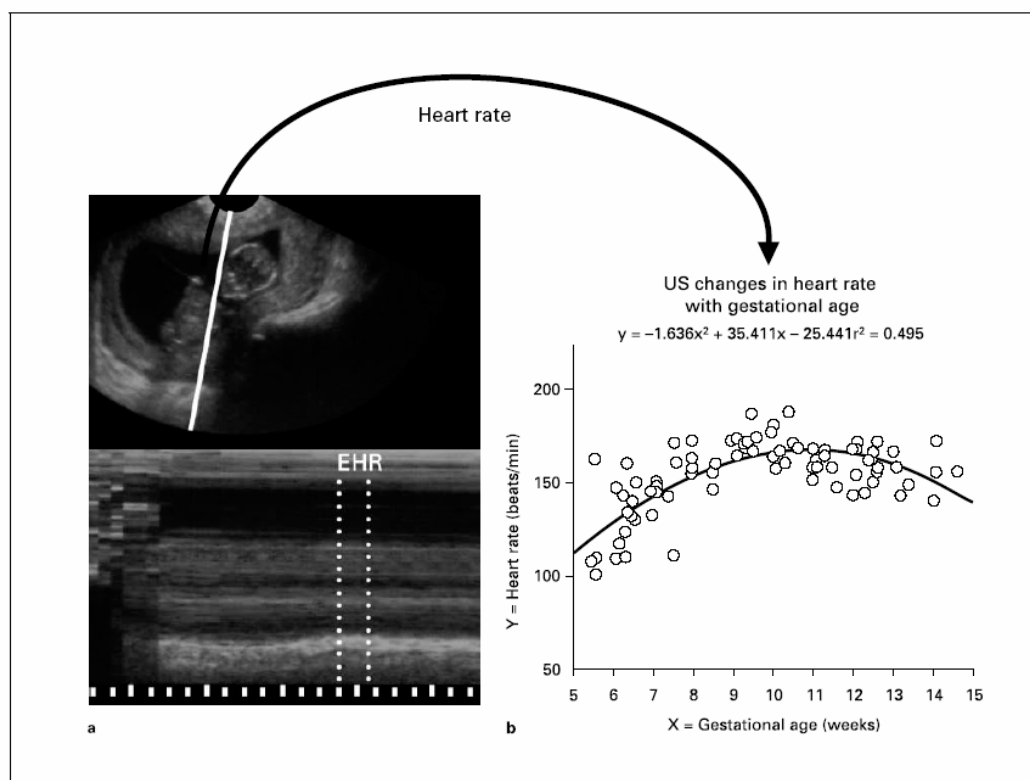


Fig. 4. a Heart rate determined by M-mode ultrasound. **b** Changes of embryonic heart rate with gestational age ($p < 0.01$).

Comment

In early embryonic development the blastocyst segments into the embryonic pole (embryoblast or inner cell mass) and the trophoblastic cells (outer cell mass). The trophoblastic cells surround both the embryoblast and the blastocoele activity. The initial attachment of the blastocyst to the uterine endometrium is established by the trophoblastic cells 6 days after fertilization. At 7–8 days after fertilization the embryoblast has differentiated into two cell layers, the epiblast and the hypoblast. The hypoblast is closest to the blastocoele cavity. In primates, between 8 and 9 days after fertilization, a primordial amniotic cavity develops by cavitation within the epiblast layer. Those

epiblastic cells adjacent to the hypoblast are columnar while those that are pushed away from the embryo become very thin and eventually open to the overlying trophoblast creating a temporary tropho-epiblastic cavity. From the edges of the epiblast, low cuboidal amnioblast cells develop and migrate rapidly toward one another along the inner surface of the overlying trophoblast to create the definitive amniotic sac by the 11th day after fertilization. A cuboidal type of epithelial cells, which will become squamous epithelium of the extraembryonic endoderm, forms Heuser's membrane. Heuser's membrane is an expansion of the hypoblast beyond the margins of the epiblast. It covers about one half of the blastocoele's cavity by 7–8 days postfertilization and will transform the

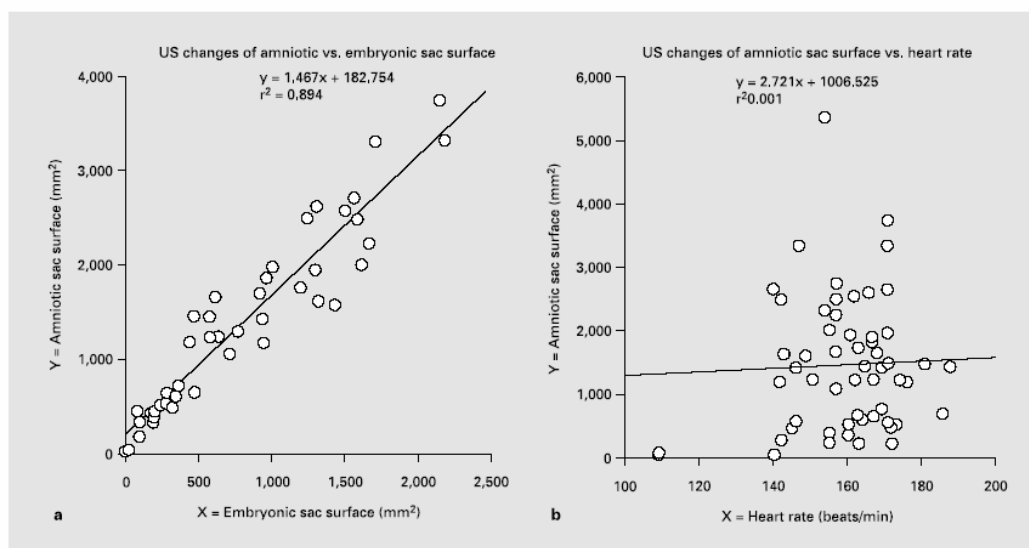


Fig. 5. a Correlation between amniotic sac area and embryonic sac area ($p < 0.01$). **b** No correlation could be determined between amniotic sac area and embryonic heart rate ($p = 0.798$).

blastocoele's cavity into the primary yolk sac. The cytotrophoblast expansion into the uterine decidua is a faster process than development of the primary yolk sac. This results in a mesh-like array of extraembryonic endoderm reticulum between the cytotrophoblast and the primary yolk. The rapid expansion of the cytotrophoblast forces the extraembryonic reticulum to break and the primary yolk sac to 'partially disintegrate' forming the secondary yolk sac. Extraembryonic mesoderm originating from the epiblast starts to appear underneath the cytotrophoblast 12 days after fertilization. By day 16, it also appears around the secondary yolk sac and amniotic cavity. The extracelomic cavity separates the extraembryonic mesoderm beneath the cytotrophoblast (somatic mesoderm) from the extraembryonic mesoderm layer surrounding the secondary yolk sac (splanchnic mesoderm). By day 17–19, primitive human capillary-like vessels will develop independently in the mesoderm of the yolk sac and in the mesoderm of the chorion. Blood cells are evident in the vessels of the yolk sac and chorion by 20 days' gestation and are detected by 23 days in the chorionic villi [17–21].

The composition and physiologic changes occurring within the AS, YS, and ECS have been partially evaluated through histological, biochemical, and biophysical studies performed in humans and in the non-human primate model [22–28]. Furthermore, it has been postulated that during the first trimester of pregnancy, expansion of the AS could be due to changes in embryonic heart rate or due to leakage of embryonic interstitial fluid into the amniotic sac [22, 29]. However, in reality, very little is known about the factors that may determine amniotic fluid accumulation during the first trimester of pregnancy. We do know that during the second trimester of pregnancy the uterus expands due to a continuous positive intra-amniotic sac pressure [30]. The amniotic sac must accumulate fluid during the first trimester of pregnancy to build up a positive intra-amniotic pressure and fuse the amniotic membrane with the gestational sac.

We do hypothesize that AS expansion follows three phases:

The initial phase occurs before the vitelline circulation is established. During this phase, the yolk sac behaves as a primitive gut allowing for transfer of water and solutes from the extracelomic space to the embryo and through

the embryonic layers into the amniotic sac. The mechanism by which this occurs before 6 weeks of pregnancy may depend on osmotic gradients [22–28]. During this initial phase, the amniotic sac may serve as a primitive lymphatic system and fluid reservoir since histological studies have demonstrated that the human lymphatic system does not become functional until 3–4 weeks after the cardiovascular system is established [31].

The intermediate phase could depend on the vitelline and incipient feto-placental circulation. Jauniaux et al. [32] provided evidence of this flow system at approximately 9 weeks of pregnancy using inulin, an inert substance that crosses from the maternal circulation to the extracelomic space. From there, inulin passes into the amniotic cavity where it accumulates. Transfer of fluid from the mother to the amniotic sac is likely to be circulation dependent. Moscoso [22] and Kupesic et al. [33] have independently described a functional YS circulation supporting this phase. They also suggested that from week 7 of pregnancy, this YS circulation is likely to progressively collapse in favor of the umbilical circulation. Leakage through the progressively larger non-keratinized embryonic skin surface and development of the umbilical cord are likely the source of amniotic fluid during this time period.

The final phase should start at about the 10th week of pregnancy when embryonic organs related to excretory mechanisms start contributing to the amniotic fluid accumulation. Indirect evidence of the transition from the intermediate to the final phase can be seen in table 1. Table 1 suggests that the AS and GS follow a relative parallel growth until week 9–10. A relatively low-pressure gradient between these two cavities must therefore exist before 9–10 weeks of gestation. After about 10 weeks, however, the GS grows, but the proportion of the ECS within the GS dramatically decreases suggesting a pressure gradient between the AS and ECS in favor of the AS. This may represent the first indirect sign of AS-dependent uterine growth. During this phase, the embryo has closed cardiovascular, feto-placental, lymphatic, and excretory systems, which maintain a hydrostatic pressure system within the embryo and within the amniotic sac. The latter will allow the amniotic membrane to contact the somatic extraembryonic mesoderm and for the continuous expansion of the uterus until term.

This study also confirms the strong correlation between the expansion of the embryo and amniotic sac (fig. 5). We also found that between the 8th and 14th weeks of pregnancy, the relative contribution of embryo and amniotic fluid to the overall size of the amniotic sac is

about 50% (table 1). Fetal growth by itself must be a determinant factor for AS expansion since the AS and GS ‘fuse’ and the uterus grows even in cases complicated by fetal renal agenesis.

Our data confirm that a second-degree polynomial best describes the changes in EHR (fig. 4) [29]. Tachycardia, bradycardia, and delayed fusion of the AS and the GS have been associated with fetal chromosomal and morphological anomalies [17–20]. In normal pregnancies, we found no correlation between EHR and AS expansion early in pregnancy (fig. 5). This finding may suggest that EHR supports the circulation that allows for embryonic development and growth but at these gestational ages may not be an independent determinate of the amniotic sac evolution. This study suggests that delayed AS and GS contact are more likely to be related to embryonic size than to heart rate.

In summary, we have described TVS changes occurring early in gestation. Future research could be directed to determine the relationships between (1) GS and AS in an embryonic pregnancies and missed abortions, and (2) the relationships of these compartments in embryos affected by congenital disorders of the cardiovascular, lymphatic, or urinary systems.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mrs. Jackie Power and Mrs. Terry Gimpel for technical assistance. J.D.L.L. is supported by Gregorio Marañon Hospital, University Complutense of Madrid, Spain, and the Amarillo Women’s Research Institute.

References

- 1 Santolaya-Forgas J: Physiology of the menstrual cycle by ultrasonography. *J Ultrasound Med* 1992;11:139-142.
- 2 Santolaya-Forgas J, Ramakrishnan V, Scommegna A: The menstrual cycle: Relations of biophysical and hormonal determinations in normal women of reproductive age. *Fertil Steril* 1992;58:1230-1233.
- 3 Deaton JL, Honore GM, Huffman CS, Bauguess P: Early transvaginal ultrasound following an accurately dated pregnancy: The importance of finding a yolk sac or fetal heart motion. *Hum Reprod* 1997;12:2820-2823.
- 4 Jurkovic D, Gruboeck K, Campbell S: Ultrasound features of normal early pregnancy development. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995;7:493-504.
- 5 Bree RL, Marn CS: Transvaginal sonography in the first trimester: Embryology, anatomy, and hCG correlation. *Semin Ultrasound CT MR* 1990;11:12-21.
- 6 Fossum GT, Davajan V, Kletzky OA: Early detection of pregnancy with transvaginal ultrasound. *Fertil Steril* 1988;49:788-791.
- 7 Mantoni M, Pedersen JF: Ultrasound visualization of the human yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1979;7:459-461.
- 8 Nyberg DA, Mack LA, Harvey D, Wang K: Value of the yolk sac in evaluating early pregnancies. *J Ultrasound Med* 1988;7:129-135.
- 9 Goldstein S: Embryonic death in early pregnancy: A new look at the first trimester. *Obstet Gynecol* 1994;84:294-297.
- 10 Levi CS, Lyons EA, Zheng XH: Endovaginal US: Demonstration of cardiac activity in embryos of less than 5 mm in crown-rump length. *Radiology* 1990;176:71-76.
- 11 Achiron R, Tadmor O, Mashiach S: Heart rate as predictor of first trimester spontaneous abortion after ultrasound-proven viability. *Obstet Gynecol* 1991;78:330-334.
- 12 Liao A: Fetal heart rate in chromosomally abnormal fetuses; in Nicolaides KH, Sebire NJ, Snijders JM (eds): *The 11-14 Week Scan: The Diagnosis of Fetal Abnormalities*. Parthenon, London, 1999, pp 33-36.
- 13 Ulm B, Ulm MR, Bernaschek G: Unfused amnion and chorion after 14 weeks of gestation: Associated fetal structural and chromosomal abnormalities. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:392-395.
- 14 Kaufman AJ, Fleischer AC, Thieme GA, Shah DM, James AE Jr: Separated chorionamnion and elevated chorion: Sonographic features and clinical significance. *J Ultrasound Med* 1985;4:119-125.
- 15 Matias A, Huggon I, Areias JC, et al: Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with abnormal ductus venosus blood flow at 10-14 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;14:307-310.
- 16 Hadlock FP, Shah YP, Kanon DJ, Lindsey JV: Fetal crown-rump length: Reevaluation of relation to menstrual age (5-18 weeks) with high-resolution real-time US. *Radiology* 1992;182:501-505.
- 17 Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ: Implantation and survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345:1400-1408.
- 18 Larsen W: The second week; in Larsen W (ed): *Essential of Human Embryology*. Edinburgh, Churchill-Livingstone, 1998, pp 21-30.
- 19 Carlson BM: Formation of germinal layers and derivatives; in Carlson BM (ed): *Human Embryology and Developmental Biology*. St Louis, Mosby, 1999, pp 62-77.
- 20 Luckett WP: Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in primate human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152:59-98.
- 21 Luckett WP: The development of primordial and definitive amniotic cavities in early rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat* 1975;144:149-168.
- 22 Moscoso G: On flux in extraembryonic fluids (opinion). *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:389-391.
- 23 Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, et al: Biochemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991;78:1124-1128.
- 24 Campbell J, Wathen N, Macintosh M, et al: Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1992;99:563-565.
- 25 Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, et al: Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1993;8:782-787.
- 26 Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, et al: Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1124-1137.
- 27 Campbell J, Wathen NC, Merryweather I, et al: The coelomic cavity: An important site of maternal-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1995;100:765-767.
- 28 Wathen NC, Delves HT, Campbell DJ, Chard T: The coelomic cavity: A reservoir for metals. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1884-1888.
- 29 Birnholz JC, Madanes AE: Amniotic fluid accumulation in the first trimester. *J Ultrasound Med* 1995;14:507-602.
- 30 Nicolini U, Fisk NM, Talbert DG, Rodeck CH, Kochenour NK, Greco P, Hubinont C, Santolaya J: Intrauterine manometry: Technique and application to fetal pathology. *Prenat Diagn* 1988;9:243-254.
- 31 Van der Putte SCJ: The development of the lymphatic system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1975;51:1-60.
- 32 Jauniaux E, Lees C, Jurkovic D, et al: Transfer of inulin across the first trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:33-36.
- 33 Kupesick S, Kurlack A, Ivanaeciac-Koaesuta M: Volume and vascularity of the yolk sac studied by three-dimensional ultrasound and color Doppler. *J Perinat Med* 1999;27:91-96.

Maternal Serum Free β -hCG Levels in Uncomplicated Pregnancies at the 10th–14th Week of Gestation and the Development of Obstetric Complications

Juan De León, M.D., George Sifuentes, M.D., Cullen Hopkins, M.D., Vivian Noble, B.S., Terry Gimpel, B.S., Thomas Myles, M.D., and Joaquin Santolaya-Forgas, M.D., Ph.D.

OBJECTIVE: To determine if free β -human chorionic gonadotropin (hCG) serum levels at the 10th–14th week of gestation were different in groups of women who had experienced pregnancy complications.

STUDY DESIGN: The obstetric records of women who had uncomplicated pregnancies when they consented to donate blood for biochemical research purposes early in pregnancy were reviewed.

Two hundred thirteen of these women had donated blood at the 10th–14th week of gestation. Of these, 135 had uneventful pregnancies and delivered at term, 19 delivered before 37 weeks' gestation, 10 had fetuses small for gestational age, 4 developed pregnancy-induced hypertension, 7 developed gestational diabetes, 10 aborted spontaneously, 4 had an intrauterine fetal death after 20 weeks' gestation, and 24 were lost to follow-up. After the clinical groups had been identified, the 213 maternal serum stored samples were thawed and free β -hCG measured by enzyme-linked immunosorbent assay. After normalization of the data, ANOVA was used to compare mean gestational age and mean free β -hCG levels within groups.

RESULTS: The overall mean gestational age at maternal blood sampling was 12.5 weeks. All groups had similar

gestational ages at blood sampling ($P = .18$). The overall mean free β -hCG serum level was 18.05 mIU/mL. Only the group of women who went on to experience spontaneous abortions had significantly lower free β -hCG levels (mean, 10.45 mIU/mL; $P < .03$).

CONCLUSION: Our data suggest that of the groups with obstetric complications evaluated, only the group of women who experienced spontaneous abortions had

significantly different serum levels of free β -hCG at the 10th–14th week of gestation. (J Reprod Med 2003; 48:0000–0000)

Keywords: pregnancy complications; human chorionic gonadotropin, beta subunit; abortion, spontaneous.

Human chorionic gonadotropin (hCG) is a heterodimer of a common α and a hormone-specific β subunits noncovalently linked by disulfide bonds. β -hCG has 83% homology with β -luteinizing hormone (LH) but contains an additional C-terminal 24 amino acid extension with 4 additional O-linked glycosylation sites.¹ This structural difference and

Patients experiencing spontaneous abortions [seem to] have lower serum concentrations of free β -hCG at the 10th–14th weeks of gestation....

From the Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound, Department of Obstetrics and Gynecology, Texas Tech University Health Sciences Center at Amarillo.

Address reprint requests to: Joaquin Santolaya-Forgas, M.D., Ph.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Texas Tech University Health Sciences Center, 1400 Coulter, Amarillo, TX 79106 (jsf@ama.ttuhsu.edu).

Financial Disclosure:

0024-7758/03/4800-0000/\$15.00/0 © Journal of Reproductive Medicine®, Inc.
The Journal of Reproductive Medicine®

1

the capacity of the placenta to glycosylate the β -hCG, thus reducing its rate of metabolism, explains the longer circulatory half-life and higher biopotency of hCG over LH, the unique biologic activity and the specificity in radioimmunoassays.² hCG is thought to act by way of the LH receptor to support the corpus luteum, allowing survival of the incipient pregnancy.³ During pregnancy, the rate of cytotrophoblastic differentiation into syncytiotrophoblast cells appears to regulate hCG synthesis.⁴

Maternal serum PAPP-A, α -fetoprotein, unconjugated estradiol, inhibin-A, hCG and free β -hCG are useful screening markers for chromosomal abnormalities, congenital anomalies and adverse pregnancy outcomes.⁵⁻⁸ The aim of this study was to determine if groups of women experiencing obstetric complications had statistically different maternal serum concentrations of β -hCG at the 10th–14th week of pregnancy. Our null hypothesis was that there was no difference between clinical groups at a probability of .05.

Materials and Methods

The obstetric records of women who had consented to donate blood for biochemical research purposes early in pregnancy were reviewed in a Texas Tech institutional review board-approved protocol. At the time of blood donation, the patients had a positive pregnancy test, uncomplicated pregnancies and provided the date of the last menstrual period. Two hundred thirteen women had donated blood

at the 10th–14th week of gestation. One hundred thirty-five of these patients had an uncomplicated pregnancy and delivered term, appropriate-for-gestational-age neonates; 19 delivered before 37 weeks' gestation due to preterm labor; 10 had small-for-gestational-age newborns; 4 developed pregnancy-induced hypertension; 7 developed gestational diabetes; 10 had spontaneous abortions (SABs); 4 had intrauterine fetal death after 20 weeks' gestation; and 24 were lost to follow-up. None of these patients had >1 of the obstetric complications. For the purpose of this study, gestational ages at delivery and at maternal blood donation were determined using ultrasonographic fetal biometric evaluations except in those who experienced a spontaneous miscarriage before the scheduled date for ultrasound evaluation. Appropriate and small size for gestational age were determined by plotting the newborn weights in a published nomogram.⁹

After the clinical groups and gestational ages at maternal blood donation had been determined, the 213 maternal serum samples were thawed at once (from -70°C), and free β -hCG levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in 500 μL of the samples.

Median values for gestational age at blood donation and for free β -hCG levels were calculated for each of the clinical groups at weekly intervals. The gestational age and free β -hCG weighted medians of each group were then calculated. A logarithmic

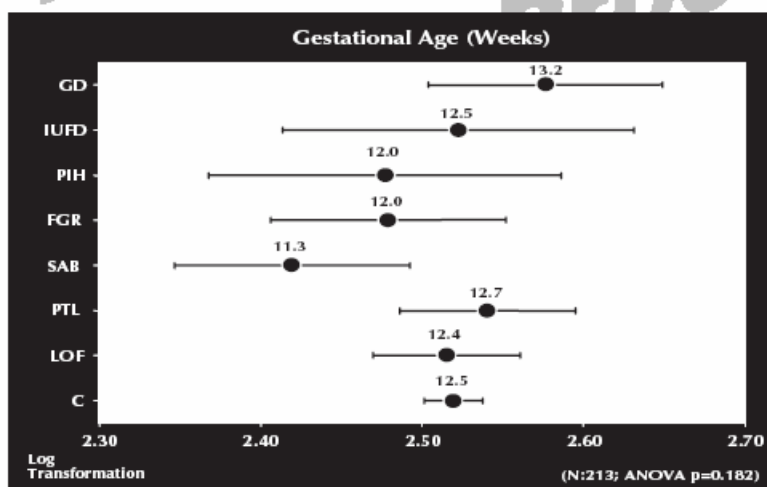


Figure 1 Mean age (95% confidence interval) at maternal blood sampling in 8 groups of patients. No differences were found between groups (ANOVA, $P = .182$). GD = gestational diabetes ($n = 7$), IUFD = intrauterine fetal death ($n = 4$), PIH = pregnancy-induced hypertension ($n = 4$), SGA = small for gestational age ($n = 10$), SAB = spontaneous abortion ($n = 10$), PTL = preterm labor ($n = 19$), LOF = lost to follow-up ($n = 24$), C = control ($n = 135$).

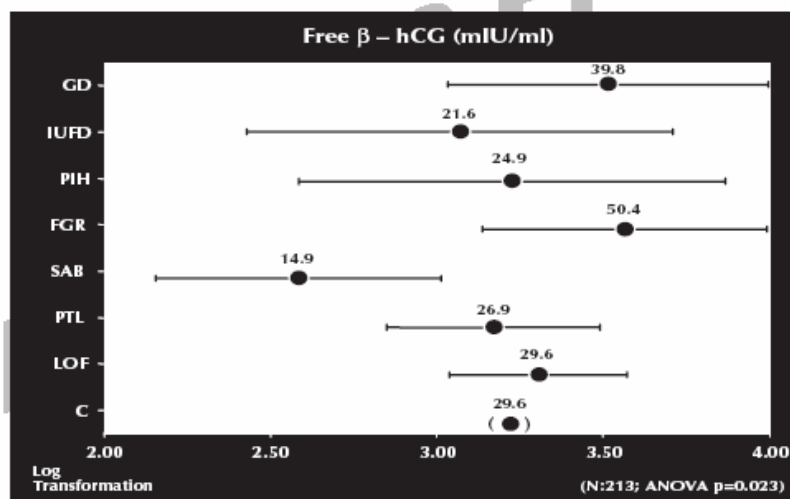


Figure 2 Mean maternal serum values of free β -hCG (95% confidence interval) in 8 groups of patients. The group of patients experiencing SABs ($n = 10$) had a significantly lower free β -hCG mean value at the 10th–14th week of gestation (ANOVA, $P < .03$). Abbreviations and numbers in groups as in Figure 1.

transformation was then performed for normalization of data, which was confirmed with histograms. ANOVA was then used to compare mean gestational age and mean free β -hCG within groups.

Results

The overall mean gestational age at maternal blood sampling was 12.5 weeks. Figure 1 shows that all groups had similar gestational ages at maternal blood donation (ANOVA, $P = .18$).

The overall mean free β -hCG serum level was 18.05 IU/mL. Figure 2 shows that only the SAB had a significantly different mean maternal serum free β -hCG level at the 10th–14th week of gestation (mean, 10.45 IU/mL; ANOVA, $P < .03$).

Discussion

Most protocols for first- and second-trimester maternal serum screening for chromosomal abnormalities and for abnormal pregnancy outcome include maternal serum free β -hCG or hCG determinations.^{5–7} Maternal serum free β -hCG levels peak at approximately 100 IU/mL at 80–90 days of gestation. After 10 weeks' gestation, the levels begin to decrease, becoming < 20 mIU/mL by midpregnancy and remaining at that level until term. During the first trimester of pregnancy, high and low maternal serum hCG levels have been associated with a greater risk of SAB, ectopic pregnancy, trophoblastic disease and multiple gestation.⁸ From 15

to 20 weeks of pregnancy, a greater risk of adverse pregnancy outcome has also been associated with elevated levels of hCG.^{10,11} The use of maternal serum free β -hCG from 10 to 15 weeks of pregnancy for predicting such obstetric complications as preterm labor, pregnancy-induced hypertension, fetal growth restriction, gestational diabetes, second-trimester abortion and intrauterine fetal death is controversial.¹²

Our primary aim in this study was to determine if groups of patients with complications of pregnancy had statistically different mean values of free β -hCG while they were asymptomatic and at the 10th–14th weeks of gestation. For the purpose of establishing the basis for tests of significance, we formulated a clinical null hypothesis (no difference in maternal serum mean free β -hCG values within groups), performed 2-way ANOVA after normalization of the data and calculated the resulting probability to either reject ($P < .05$) or accept ($P > .05$) the null hypothesis. Previous studies evaluated β -hCG serum levels early in pregnancy and then studied the outcomes to compare the percentage of patients with low or normal serum β -hCG levels who developed clinical complications, such as low birth weight or pregnancy-induced hypertension.

Our aim was not to develop a screening test for pregnancy-induced hypertension or low birth weight but to determine if there were differences in the mean free β -hCG serum levels obtained from

each clinical group while the pregnancy was clinically uncomplicated. To avoid ascertainment bias, we defined the clinical groups, gestational ages at delivery and gestational ages at maternal blood donation prior to free β -hCG serum measurements. A "dummy group" lost to follow-up was intentionally included. Figure 2 shows that the mean value of free β -hCG was significantly lower for the group of pregnancies ending with SAB; therefore, we rejected the null hypothesis.

Our clinical interpretation, based on rejection of the null hypothesis and previously published data,¹³ is that patients experiencing SABs, as a group, have lower serum concentrations of free β -hCG at the 10th–14th weeks of gestation, most probably due to an abnormal rate of cytotrophoblastic differentiation into syncytiotrophoblast cells, which are thought to regulate hCG synthesis.⁴ Since our study had a relatively small sample size and was retrospective and since none of our patients had an ultrasound evaluation at the time of blood donation, we cannot use it to determine the sensitivity of different cutoff values at different gestational ages as screening tests for miscarriage or to confirm if a lower free β -hCG level in maternal serum in the SAB group was due to anembryonic pregnancies.¹⁴ Future studies could be aimed at these questions and also could determine if maternal serum free β -hCG values and/or sonographic evaluations at 10–15 weeks' gestation can be used for reassuring women with a history of recurrent pregnancy loss.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge J. Canick for his biostatistical assistance and Daniel V. Castracane, Ph.D., for his laboratory support.

References

1. Gharib SD, Wierman ME, Shuprik MA, et al: Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrinol Rev* 1990; 11:177–199
2. Puett D, Bhowmick N, Fernandez LM, et al: hCG-receptor binding and transmembrane signaling. *Mol Cell Endocrinol* 1996;125:55–64
3. Santolaya-Forgas J, Meyer WJ, Burton BK, et al: Altered newborn gender distribution in patients with low mid-trimester maternal serum human chorionic gonadotropin (MShCG). *J Matern Fetal Med* 1997;6:111–114
4. Hay DL: Placental histology and the production of human chorionic gonadotropin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988;95:1268–1275
5. Spencer K, Nicolaides KH: A first trimester trisomy 13/trisomy 18 risk algorithm combining fetal nuchal translucency thickness, maternal serum free beta-hCG and PAPP-A. *Prenat Diagn* 2002;22:877–879
6. Hallahan T, Krantz D, Orlandi F, et al: First trimester biochemical screening for Down syndrome: Free beta hCG versus intact hCG. *Prenat Diagn* 2000;20:785–790
7. Yaron Y, Ochshorn Y, Heifetz S, et al: First trimester maternal serum free human chorionic gonadotropin as a predictor of adverse pregnancy outcome. *Fetal Diagn Ther* 2002; 17:352–356
8. Santolaya-Forgas J, Burd LI, Burton BK: Clinical significance of low levels of second-trimester maternal serum human chorionic gonadotropin. *Fetal Diagn Ther* 1994;9:362–366
9. Liabchenco LO, Hansman C, Boyd E: Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 1966;37: 403–408
10. Gerulath AH, Ehlen TG, Besette P, et al: Gestational trophoblastic disease. *J Obstet Gynaecol Can* 2002;24:434–446
11. Merviel P, Muller F, Guibourdenche J, et al: Correlations between serum assays of human chorionic gonadotropin (hCG) and human placental lactogen (hPL) and pre-eclampsia or intrauterine growth restriction (IUGR) among nulliparas younger than 38 years. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:59–67
12. Ong CY, Liao AW, Spencer K, et al: First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. *Br J Obstet Gynaecol* 2000;107:1265–1270
13. Bjercke S, Tanbo T, Dale PO, et al: Human chorionic gonadotropin concentrations in early pregnancy after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1999;14:1642–1646
14. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, et al: Biochemical composition of the coelomic fluid in anembryonic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:849–853

Insulin like growth factor II regulatory system for the Obstetrician and Gynecologist.

J.A. De Leon M.D. and J. Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.,
Amarillo Women's Health Research Institute.
Texas Tech University Health Sciences Center.
Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound.
Department of Obstetrics and Gynecology
1400 Coulter. Amarillo, TX 79106.

Reprint request and correspondence:

Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.
Texas Tech University Health Sciences Center
Department of Obstetrics and Gynecology
1400 Coulter. Amarillo, TX 79106.
Telephone: 806-3544608; FAX: 806-354-5516
jsf@ama.ttuhs.edu

PRECIS

In vitro and in vivo studies have demonstrated the clinical relevance of the IGF-II system. IGF-II participates in the regulation of ovarian follicle growth, steroidogenesis and atresia, and stimulates estradiol production by granulosa cells. Administration of IGF II has growth-promoting effects in various tissues in experimental animal models and somatic growth in GH receptor-deficient children. Early in pregnancy low maternal serum PAPP-A may lead to a down regulation of IGF-II availability and this may be a cause for spontaneous abortion and perhaps other pregnancy complications.

Key Words: First trimester of pregnancy/ Insulin Like growth factors/ PAPP-A/ Spontaneous abortion.

Review

The insulin-like growth factor system is comprised of the IGF-I and II, their binding proteins (IGFBP 1 through 6), IGFBP proteases, and the IGF receptors. IGF-I and II may interact with three distinct receptors: the insulin receptor, the IGF-I receptors, and the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor. The insulin and IGF-I receptors are structurally very similar [1]. The IGF-I receptor binds both IGF-I and IGF-II with equally high affinity and insulin with low affinity [2]. IGF-II receptor consists of a single polypeptide chain lying primarily outside the cell with a short cytoplasmic domain. In contrast to IGF-I receptor, the IGF-II receptor binds IGF-II with high affinity, IGF-I with three orders of magnitude lower affinity, and does not bind insulin at all. The IGF-II receptor has been shown (in certain cells) to induce Ca^{2+} influx by a mechanism involving G protein coupling to its short cytoplasmic domain [1-3].

The liver produces most of the circulating IGF-I and II. Under normal physiological conditions, IGF-I and IGF-II circulate at concentrations about 100- to 1,000-fold greater than insulin but do not normally cause hypoglycemia because the overall biological actions of IGF are regulated by: 1) synthesis of specific serum and extracellular IGFBPs; 2) the complex interrelationship between IGF and IGFBP which is dependent on the phosphorylation or proteolysis of IGFBP, and 3) modulation of receptor levels and post-receptor signaling pathways [3, 4]. In serum 75-80% of IGF-II circulates as a 150-200-KDa complex, ~20% as a 50-KDa complex, and less than 1% of IGF-II is known to circulate as a free form. The 150-200-kDa complexes consist primarily of IGF-II, IGFBP-4, and an acid-labile subunit (ALS). The size of the IGF-II-IGFBP-4-ALS complex does not allow it to pass through the vascular endothelium and therefore must be spliced through the proteolysis of IGFBP-4 [5].

In women, IGF-I and II participate in the regulation of ovarian follicle growth, steroidogenesis and atresia, and also stimulates estradiol production by cultured human granulosa cells [6]. In vitro and in vivo animal and human studies have also demonstrated the clinical relevance of these IGFs. IGF-I and II act both systemically and locally to promote proliferation and differentiation in a variety of cell types. Administration of IGF-I and II also exhibit growth-promoting effects in various tissues, including bone growth in experimental animal models and somatic growth in GH receptor-deficient children. In mice, knocking out (by homologous recombination) one of the IGF-I genes reduces pup size to 60% of normal littermates; if both genes are knocked out, the pup size is reduced by 70% [7, 8]. IGF-I concentrations have been shown to be decreased in human cord sera of intra-uterine growth restricted and small for gestational age newborns while they are increased in large for gestational age newborns [9, 10]. Finally, the potential clinical applications of IGF-I receptor agonists in preventing neural damage in the central nervous system after stroke and in cancer are under investigation [11, 12].

IGF-II is a 67-amino acid peptide with high degree of sequence conservation among various vertebrate species. In humans, the IGF-II gene maps to the short arm of chromosome 11 adjacent to the gene encoding for insulin [13]. It spans 30 Kb and consists of 9 exons. The last 4 exons encode prepro-IGF-II. In adults, IGF-II mRNA expression is limited to the choroid plexus and leptomeninges and is secreted into the cerebral spinal fluid where it reaches neuronal and

glial cells throughout the brain. IGF-II gene expression is enhanced in a number of cancers, possibly reflecting a role for tumor growth [3]. IGF-II is also highly expressed during the prenatal period because its promoter is tissue, hormonal, and developmental-stage-regulated [14, 15]. IGF-II mRNA is present in numerous mesoderm-derived tissues and in cells at the leading edge of the columns of chorionic villi invading the maternal decidua [16-18]. IGF-II is known to signal through the IGF-II receptor in endometrial epithelial cells [4]. Interestingly, IGF-II gene is repressed in the maternal genome and active only in the paternal genome. Paternally expressed IGF-II is a determinant of the size of the placenta and acts to channel maternal resources to the fetus and modulating fetal growth [19-21].

IGF-I and IGF-II are important regulators at the fetal-maternal interface. It is believed that trophoblast invasion of the decidualized endometrium is partly regulated by the autocrine-paracrine effect of the IGF-II produced by the extravillous trophoblast cells and the IGFBP-1 produced by adjacent decidual cells. Since IGF-II can enhance the proteolytic effect on IGFBP-1, it also contributes to IGF-I bioavailability in these tissues. However, for all of these effects to occur, IGF-II has to be dissociated from IGFBP-4 [4, 22].

IGFBPs are ubiquitously expressed and serve as: 1) reservoirs for IGFs, 2) participate in the transport of IGFs, and 3) control the tissue bioavailability of IGFs [23, 24]. At least six IGFBPs have been characterized and each has 18-20 similarly spaced cysteines clustered in the amino and carboxy-terminal of the molecule [3]. IGFBP-4 is produced by the decidua and is the second most abundant IGFBP in the placental bed (IGFBP-1 is the most common) [16]. IGFBP-4 is a consistent inhibitor of IGF-I and IGF-II actions with only one potential N-linked glycosylation site that can be cleaved at a Met and Lys site by PAPP-A [5, 25].

PAPP-A is a metalloproteinase with an elongated zinc-binding motif which is strictly conserved within the metzincins protein family and has been identified as the Insulin Growth Factor Binding Protein 4 protease [6, 26, 27]. By disrupting the IGF-II-IGFBP-4 complex, PAPP-A allows for IGF-II bioavailability and therefore, plays an important role in local proliferative responses such as in wound healing, bone remodeling, atherosclerotic plaque development, and in several other aspects of human reproduction [5, 6, 25, 27-30]. PAPP-A has been identified in the serum of pregnant women in increasing concentrations throughout pregnancy [6, 31-33]. At the maternal-fetal interface, IGF-II bioavailability mediated by PAPP-A allows for trophoblast invasion into the maternal decidua, for steroidogenesis and for glucose and amino acid transport into the chorionic villous cytotrophoblast [34, 35].

The PAPP-A (the IGFBP-4 protease) gene maps to the long arm of chromosome 9 and has been well characterized [36-38]. The PAPP-A gene has an encrypted gene encoding for the pro-MBP protein which binds to PAPP-A to inhibit its proteolytic effect on IGFBP-4 [14, 39, 40]. PAPP-A mRNA is expressed in syncytiotrophoblasts, extravillous cytotrophoblasts, and the extracellular matrix in placental septae [41, 42]. PAPP-A protein has a proteolytic domain (PD), three lin-notch repeats domain (LNR), and five complement control protein modules domain (CC). The PD allows for the cleavage of recombinant human IGFBP-4 into 18- and 14-kDa fragments. LNR domain is known from the Notch-related receptors, which play important roles

in the regulation of developmental programs [39]. CCP domain are found in several other proteins, in particular the complement system [43]. The CCP-3 and -4 domains mediate cell surface adhesion of the protein which may induce proteolysis of IGFBP-4 on the cytotrophoblast cell membrane to enhance IGF-II action for regulation of glucose and amino acid uptake [44]. In contrast to membrane localized PAPP-A, secreted PAPP-A may proteolyze decidual derived IGFBP-4 for paracrine actions of IGF-II on the decidual stromal or vascular cells and may even potentiate other IGF induced maternal tissue growth during pregnancy [45]. Overall enhancement of IGF-II may facilitate trophoblast invasion into the maternal decidua [46]. PAPP-A activity appears to be dependent on the presence of metal ions since inhibition of PAPP-A activity can be achieved by metal chelators such as EDTA and EGTA [14].

Early in pregnancy, maternal serum levels of PAPP-A rise above baseline levels [5]. A gradient of PAPP-A has been determined between maternal serum and extracellular and amniotic fluid compartments (>>>>). Low maternal serum PAPP-A values have been found in pregnancies affected by trisomy 21, trisomy 18, and trisomy 13 compared to the normal range of values at the corresponding gestational ages [27, 31, 47]. During the second trimester of pregnancy, levels continue to fall in cases of trisomy 18 but become normal in trisomy 21 [47, 48]. These findings have allowed for biochemical prenatal screening for these conditions with an estimated sensitivity for detection of trisomy 21 close to 90% with a false positive rate of 5% if associated with ultrasonographic markers such as increased fetal nuchal translucency [49].

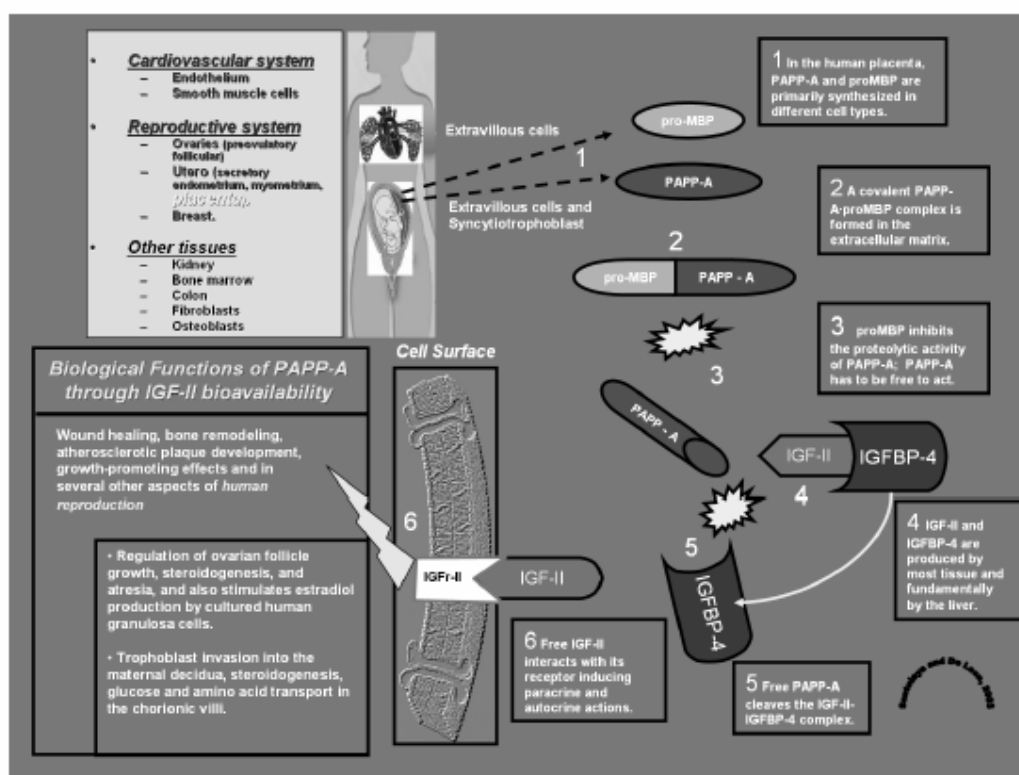
Maternal serum biochemical markers have been used to identify women at greater risk for adverse pregnancy outcomes [47, 50-53]. Recent studies support the concept that some patients suffering spontaneous abortions and other complications of pregnancy may have lower serum concentrations of PAPP-A at 10⁻¹ - 14⁺⁶ weeks gestation and that this finding may be related to a decreased bio-available IGF-II both at the maternal-placental interface and within the early gestational sac (54-57).

The clinical information mentioned throughout this review article is summarized in the Figure 1.

FOOT NOTES

Fig 1. Graphic representation of PAPP-A production and biological activity through the IGF-II regulatory system in humans.

Figure 1. Relationships between PAPP-A, IGF-II and IGFBP-4



REFERENCES

1. De Meyts, P. and J. Whittaker, *Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(10): p. 769-83.
2. Soos, M.A., C.E. Field, and K. Siddle, *Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity*. Biochem J, 1993. **290** (Pt 2): p. 419-26.
3. LeRoith, D., et al., *Insulin-like growth factors*. Biol Signals, 1992. **1**(4): p. 173-81.
4. Gibson, J.M., et al., *Regulation of IGF bioavailability in pregnancy*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(1): p. 79-87.
5. Byun, D., et al., *Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum: determination of IGF-II dependency and localization of cleavage site*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(1): p. 373-81.
6. Conover, C.A., et al., *Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(12): p. 4742-5.
7. Liu, J.P., et al., *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r)*. Cell, 1993. **75**(1): p. 59-72.
8. Powell-Braxton, L., et al., *IGF-I is required for normal embryonic growth in mice*. Genes Dev, 1993. **7**(12B): p. 2609-17.
9. Giudice, L.C., et al., *Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(5): p. 1548-55.
10. Langford, K.S., et al., *Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) levels and IGFBP-3 protease activity in normal, abnormal, and multiple human pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(1): p. 21-7.
11. Khandwala, H.M., et al., *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 215-44.
12. Blume, A.J., J. Beasley, and N.I. Goldstein, *The use of peptides in Diogenes: a novel approach to drug discovery and phenomics*. Biopolymers, 2000. **55**(4): p. 347-56.

13. Louvi, A., D. Accili, and A. Efstratiadis, *Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development*. *Dev Biol*, 1997. **189**(1): p. 33-48.
14. Giudice, L.C., et al., *Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(5): p. 2359-66.
15. Zhou, J., et al., *Primate mammary gland insulin-like growth factor system: cellular localization and regulation by sex steroids*. *J Investig Med*, 2001. **49**(1): p. 47-55.
16. Han, V.K., et al., *The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(7): p. 2680-93.
17. Wang, C.Y., et al., *Insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid in the developing human placenta and in term placenta of diabetics*. *Mol Endocrinol*, 1988. **2**(3): p. 217-29.
18. Zhou, J. and C. Bondy, *Insulin-like growth factor-II and its binding proteins in placental development*. *Endocrinology*, 1992. **131**(3): p. 1230-40.
19. Constancia, M., et al., *Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 945-8.
20. Reik, W., et al., *Imprinted genes and the coordination of fetal and postnatal growth in mammals*. *Novartis Found Symp*, 2001. **237**: p. 19-31; discussion 31-42.
21. Reik, W., et al., *Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes*. *J Physiol*, 2003. **547**(Pt 1): p. 35-44.
22. Hamilton, G.S., et al., *Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1*. *Exp Cell Res*, 1998. **244**(1): p. 147-56.
23. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. *Endocr Rev*, 1995. **16**(1): p. 3-34.
24. Jones, J.I., M.E. Doerr, and D.R. Clemmons, *Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs*. *Prog Growth Factor Res*, 1995. **6**(2-4): p. 319-27.

25. Byun, D., et al., *Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 847-54.
26. Boldt, H.B., et al., *Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 2): p. 359-67.
27. Lawrence, J.B., et al., *The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 3149-53.
28. Conover, C.A., et al., *Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum*. Endocrinology, 2001. **142**(5): p. 2155.
29. van Dijk, E.L., J.S. Sussenbach, and P.E. Holthuisen, *Kinetics and regulation of site-specific endonucleolytic cleavage of human IGF-II mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(17): p. 3477-86.
30. Bayes-Genis, A., et al., *Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2001. **345**(14): p. 1022-9.
31. Bersinger, N.A., et al., *Non-placental production of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A): old and new evidence*. Early Pregnancy, 1997. **3**(2): p. 96-101.
32. Hourvitz, A., et al., *Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(12): p. 4916-20.
33. Overgaard, M.T., et al., *Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues*. Biol Reprod, 1999. **61**(4): p. 1083-9.
34. Nestler, J.E., *Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I*. Endocrinology, 1987. **121**(5): p. 1845-52.
35. Nestler, J.E., *Regulation of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts by insulin, insulin-like growth factor-I, and -II*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **44**(4-6): p. 449-57.

36. Lin, T.M., et al., *Characterization of four human pregnancy-associated plasma proteins*. Am J Obstet Gynecol, 1974. **118**(2): p. 223-36.
37. Lin, T.M. and S.P. Halbert, *Immunological comparison of various human pregnancy-associated plasma proteins*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1975. **48**(1): p. 101-15.
38. Lin, T.M. and S.P. Halbert, *Placental localization of human pregnancy-associated plasma proteins*. Science, 1976. **193**(4259): p. 1249-52.
39. Overgaard, M.T., et al., *Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2106-17.
40. Soe, R., et al., *Expression of recombinant murine pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and a novel variant (PAPP-Ai) with differential proteolytic activity*. Eur J Biochem, 2002. **269**(8): p. 2247-56.
41. Bonno, M., et al., *Localization of pregnancy-associated plasma protein-A and colocalization of pregnancy-associated plasma protein-A messenger ribonucleic acid and eosinophil granule major basic protein messenger ribonucleic acid in placenta*. Lab Invest, 1994. **71**(4): p. 560-6.
42. Wahlstrom, T., B. Teisner, and J. Folkersen, *Tissue localization of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in normal placenta*. Placenta, 1981. **2**(3): p. 253-8.
43. Kirkitadze, M.D. and P.N. Barlow, *Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 146-61.
44. Laursen, L.S., et al., *Cell surface targeting of pregnancy-associated plasma protein A proteolytic activity. Reversible adhesion is mediated by two neighboring short consensus repeats*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47225-34.
45. Han, V.K. and A.M. Carter, *Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals*. Placenta, 2000. **21**(4): p. 289-305.
46. McKinnon, T., et al., *Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3665-74.
47. Ochshom, Y., et al., *First trimester PAPP-A in the detection of non-Down syndrome aneuploidy*. Prenat Diagn, 2001. **21**(7): p. 547-9.

48. Spencer, K., et al., *First trimester maternal serum placenta growth factor (PlGF) concentrations in pregnancies with fetal trisomy 21 or trisomy 18*. Prenat Diagn, 2001. **21**(9): p. 718-22.
49. Hackshaw, A.K. and N.J. Wald, *Inaccurate estimation of risk in second trimester serum screening for Down syndrome among women who have already had first trimester screening*. Prenat Diagn, 2001. **21**(9): p. 741-6.
50. Burton, B.K., G.S. Prins, and M.S. Verp, *A prospective trial of prenatal screening for Down syndrome by means of maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, and unconjugated estriol*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**(3): p. 526-30.
51. Burton, B.K., *Outcome of pregnancy in patients with unexplained elevated or low levels of maternal serum alpha-fetoprotein*. Obstet Gynecol, 1988. **72**(5): p. 709-13.
52. Santolaya-Forgas, J., L.I. Burd, and B.K. Burton, *Clinical significance of low levels of second-trimester maternal serum human chorionic gonadotropin*. Fetal Diagn Ther, 1994. **9**(6): p. 362-6.
53. Santolaya-Forgas, J., et al., *Pregnancy outcome in women with low midtrimester maternal serum unconjugated estriol*. J Reprod Med, 1996. **41**(2): p. 87-90.
54. Spencer, K., *The influence of smoking on maternal serum PAPP-A and free beta hCG levels in the first trimester of pregnancy*. Prenat Diagn, 1999. **19**(11): p. 1065-6.
55. Ong, C.Y., et al., *First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications*. Bjog, 2000. **107**(10): p. 1265-70.
56. Smith, G.C., et al., *Early-pregnancy origins of low birth weight*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 916.

Letter to the Editor

Placental surface cyst less echogenic than amniotic fluid on a second-trimester ultrasonographic evaluation

We present a case of a placental surface cyst with less echogenicity than the surrounding amniotic fluid (Figure 1). This finding was discovered when a 31-year-old Caucasian woman presented during her first pregnancy for a second-trimester ultrasound examination that showed a singleton intrauterine pregnancy with a normal and active fetus with measurements consistent with 26 weeks' gestation. A cyst of about 4 cm in diameter was noted within the amniotic fluid close to the umbilical cord insertion into the placenta. The umbilical cord was morphologically normal with normal blood velocity waveforms. Color flow Doppler ruled out any vascular involvement with the cyst. During our counseling session we mentioned to the patient that (1) the clinical significance of placental surface cysts depends on the association of fetal growth restriction and (2) that most placental surface simple cysts are associated with normal pregnancy outcomes¹. The patient voiced her understanding of this information and agreed to a follow-up ultrasound evaluation and a postpartum examination of the placenta and infant. Ultrasound evaluation at 33 weeks' gestation demonstrated a fetus with appropriate interval growth. The remaining ultrasonographic findings were similar to those noted at 26 weeks' gestation. Spontaneous vaginal delivery of a normal female newborn weighing 3660 g with Apgar scores of 9 and 10 at 1 and 5 min, respectively, occurred at term. Pathological evaluation



Figure 1 Ultrasonographic image showing an anechogenic cystic structure within the amniotic fluid at 26 weeks' gestation.

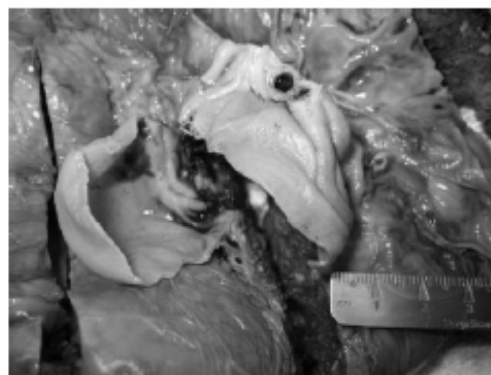


Figure 2 Gross examination of the placenta revealed a surface cyst with a subchorionic fibrin clot. The umbilical cord was normal.

demonstrated a 619 g disc-shaped placenta measuring $18.7 \times 16.6 \times 4.7$ cm. The cord was trivascular, inserted 6.5 cm from the nearest margin of the placenta and measured 51.7 cm in length and up to 1.5 cm in diameter. No knots or tears were noted. The villi were of normal maturation state and there were no clinically significant areas of infarct or severe ischemic change. On the fetal surface of the placenta a fluid-filled cyst was found located adjacent to, but independent from, the cord insertion. This cyst measured $4.6 \times 3.8 \times 3.2$ cm and had a centrally located laminated thrombus filled with fibrin (Figure 2).

In summary, we have presented evidence of a unique ultrasonographic feature, namely that of a placental surface cyst that was less echogenic than the surrounding amniotic fluid.

J. De Leon-Luis†, R. H. Oneson‡ and
J. Santolaya-Forgas*†

†Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and
Ultrasound, Department of Obstetrics and Gynecology,
Texas Tech University and Health Science Center,
1400 Coulter, Amarillo, TX 79106 and
‡Heartland Pathology Consultants, Edmon, OK, USA

*Correspondence.
(e-mail: jsf@ama.ttuhsu.edu)

DOI: 10.1002/uog.1057

Reference

1. Brown DL, DiSalvo DN, Frates MC, Davidson KM, Genest DR. Placental surface cysts detected on sonography: histologic and clinical correlation. *J Ultrasound Med* 2002; 21: 641–646; quiz 647–648.

Santolaya et al.

Chromosomal studies at 5 weeks post fertilization via celocentesis in the time-pregnant baboon model.

Santolaya-Forgas J.⁺, De Leon-Luis J.⁺, Shen Z.^{*}, McCorquodale J.^{*}, McCorquodale M.^{*}.

Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound. Texas Tech University Health Sciences Center at Amarillo, TX (+) and the Cytogenetic Laboratory at Michael Reese Medical Center. Chicago, IL (*)

Reprint request and correspondence:

Joaquin Santolaya-Forgas M.D., Ph.D.

Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound

Department of Obstetrics and Gynecology

Texas Tech University Health Sciences Center

1400 Coulter, Amarillo, TX 79106.

Telephone: 806-3544608; FAX: 806-354-5516. jsf@ama.ttuhsu.edu

Acknowledge: Dr. Juan A. De Leon-Luis is supported by Grants from the Amarillo Women's Health research Institute and from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (BEFI 02/9305).

ABSTRACT

Objective: to determine if chromosomal studies could be performed using 2 mL of extra-embryonic celomic fluid obtained at 5 weeks post-fertilization in baboons.

Material and Methods: Eight ultrasound guided celocentesis procedures were performed in the time-pregnant baboon model. Extra-embryonic celomic fluid was successfully aspirated in all cases. The initial 0.5 mL of celomic fluid was collected in a 1 mL syringe and discharged to decrease maternal cell contamination. Approximately 2 mL of celomic fluid were then collected in a 3 mL syringe. The celomic fluid was spun and the supernatant removed to a final volume of 0.5 mL. The final celomic fluid sample was placed in either: 1) in a small plastic flaskette chamber slide which allowed the mix of 0.5 mL celomic fluid / 1 mL of Amniomax culture medium and 1 mL of used fibroblast culture medium to spread on its entire surface (n:4); or 2) in a 3.5 cm x 1 cm plastic Petri dish with a 24 mm x 30 mm glass cover slip to keep the 0.5 mL celomic fluid mixed with 1 mL of Amniomax culture medium in a 1 sq-cm area (N:4). The medium was change on day 5 and then every second to third day. The cells were harvested as soon as the number of cells appeared sufficient for chromosomal analysis.

Results: Standard chromosomal studies could be performed in 5 of the 8 samples. Mean (SD) celomic fluid volume used for culture was 1.85 mL (± 0.3). Mean (SD) time to karyotype result was 18.8 days (± 1.8).

Conclusion: These preliminary study as well as previous reports suggest: 1) that there are living cells in the extra-embryonic celomic fluid of primates and, 2) that prenatal diagnosis of genetic disorders using celomic fluid is possible even at 40 days of embryonic development. The authors feel that significant improvements in our understanding of the biology of the cells present at 5 weeks post-fertilization in celomic fluid is needed to allow for the rational modifications in culture conditions that will expedite cell growth and produce reliable prenatal genetic studies for clinical use.

Key words: celocentesis, early prenatal diagnosis, baboon model.

INTRODUCTION

Chorionic villous sampling from the 10th week of pregnancy and the amniocentesis procedure from the 14th week of pregnancy are the techniques used in the majority of patients requesting prenatal diagnosis of chromosomal disorders (Goncalvez and others 1998; Wagner 1998). Recently, several authors have performed experiments in women considering termination of pregnancy and have suggested that the extra-embryonic celomic fluid could be used for prenatal diagnosis. Table 1 summarizes the indications and results of these experiments and, demonstrates the variation on the reported gestational age at sampling (rage 5-10 weeks) as well as in the celomic fluid volume used (range 0.5-10 mL).

Baboons (*Papio Anubis*) have similar reproductive systems and placentation to humans. **Studies performed in our laboratory has demonstrated that embryologically and ultrasonographically baboon and human development in a very similar manner (Figure 1)(Santolaya-Forgas and others 2003a).** The authors have used the timed-pregnant baboon model to develop new prenatal diagnostic and fetal treatment techniques as well as to gain new insights into several aspects of normal embryonic and fetal development (Kowalski and others 1995; Lemery and others 1995; Santolaya Forgas and others 2002; Santolaya-Forgas and De Leon-Luis 2002; Santolaya-Forgas and others 2003b; Santolaya-Forgas and others 1998a; Santolaya-Forgas and others 2000; Santolaya-Forgas and others 2001; Santolaya-Forgas and others 1998b; Santolaya-Forgas and others 1997; Wilson and others 1991). In our unit, we perform all ultrasound guided celocentesis procedures in this animal model at 36-42 days of embryonic development.

The aim of this study was to determine if standard chromosomal studies could be performed using approximately 2 mL of extra-embryonic celomic fluid obtained at 40 days post-conception.

MATERIAL AND METHODS:

Extra-embryonic celomic fluid sample collection:

The study was approved by the Animal Care Committees of the University of Illinois and Oklahoma University. To confirm pregnancy, 25 animals underwent ultrasonographic scanning between days 28 and 32 of gestation (delivery 184 +/- 2 days) counted from the middle day of a 3 day mating period. Eight animals were selected and ultrasound guided celocentesis procedures performed between 36 and 40 days gestation as previously described (Santolaya celocentesis safety). Briefly, before the celocentesis, all animals were sedated with an intramuscular injection of ketamine (7 mg/kg). Each animal was then placed on a table in the lithotomy position. In 4 animals a transvaginal ultrasonographic probe was covered with a condom and lubricated (Aloka SSD 650 with 5 Mhz transducer, Wallingford, Conn.). The gestational, yolk and amniotic sacs mean diameters as well as the embryonic crown-rump length were recorded. Embryonic heart rate was determined with the M-mode function of the ultrasonographic equipment. The ultrasonographic probe was then removed from the baboon's vagina. The perineum and vagina walls were then scrubbed three times with povidone-iodine and alcohol and the celocentesis procedures performed in aseptic conditions, under continuous ultrasonographic guidance, using 17-18 gauge needles through a guide attached to the transducer. The last 4 animals of these series had their abdomen shaved and scrubbed with povidone-iodine and alcohol for a trans-abdominal approach to the extra-embryonic celomic cavity. In these five animals all celocentesis procedures were performed using a 20 gauge needle, a free hand technique and under continuous ultrasonographic guidance (5 Mhz curvilinear probe). In all nine cases the needle tip was located to avoid the amniotic or yolk sacs. Only 1 attempt at sampling was performed with each animal. Pregnancies were tracked with ultrasonographic evaluations on post-procedure day 1 and 3 and once a month until delivery. No antibiotics, tocolytics, or analgesics were administered after the procedure.

Extra-embryonic celomic fluid processing:

Santolaya et al.

Between 2 and 3 mL total extra-embryonic celomic fluid were aspirated from each animal. The initial 0.5 mL was collected in a 1 mL syringe and discharged to decrease maternal cell contamination. The remaining celomic fluid was then collected with a 3 mL syringe and kept at room temperature until delivery to the cytogenetic laboratory (<2 hour period from celocentesis). **The celomic fluid was spun at 1000 rpm for 5 minutes ??? and the supernatant removed to a final volume of 0.5 mL. The number of cells per sample (approximately 5000 cells/mL) was assessed using optical microscopy. One culture was established per celomic fluid sample. Four of the cultures were established** according to previously published protocol **by mixing** the final 0.5 mL celomic fluid samples with 1 mL of Amniomax culture medium/ 1 mL of used fibroblast culture medium which was placed in a small plastic flaskette chamber slides which allowed the total volume to spread on its entire surface (Cruger and others 1996). Four of the cultures were established by mixing the final 0.5 mL of celomic fluid with 1 mL of Amniomax culture medium which was placed in a 3.5 cm x 1 cm plastic Petri dish with a 24 mm x 30 mm glass cover slip to keep the total volume in a 1 sq-cm area. In all experiments, the medium was change on day 5 and then every second to third day. When cultures were successful, the cells were harvested as soon as the number of cells appeared sufficient for metaphase analysis. Chromosomal studies were then conducted according to the American College of Medical Genetics standards and guidelines for clinical cytogenetics laboratories.

RESULTS

There were no maternal complications and the celocentesis procedure was not associated with any immediate alterations in fetal heart rate or evidence of hemorrhage within the gestational sac. On post-procedure day 3, three animals from the transvaginal celocentesis group demonstrated a fetal demise. Pregnancy continued to term in the remaining 5 animals and the perinatal outcome was normal according to institutionally derived clinical assessment protocols and nomograms.

Mean (SD) celomic fluid volume samples used for cell culture and time to karyotype results were 1.85 (\pm 0.3) mL and 18.8 (\pm 1.8) days. Karyotype analysis was possible in 5 of the 8 samples. Success rate for cultures was 50% when the celocentesis were performed tranvaginally and 75% when performed transabdominally.

Table 2 summarizes results from the 8 experiments indicating the extra-embryonic celomic fluid volume received by the cytogenetic laboratory, route and needle used for ultrasound guided celocentesis procedure, type of container and medium used, days of culture, karyotype result and outcome of the pregnancy.

Figure 2 depicts a celomic fluid 42,XY karyotype from animal 6145 and the computer allocation of the chromosomes on a human ideogram.

DISCUSION

The earlier in pregnancy genetic defects are diagnosed, the easier it is for a patient to decide on the medical management to pursue. Investigators from Kings College were the first to report on the ultrasound guided celocentesis. They performed the technique in patients prior to elective terminations of pregnancy and between the 8th and 10th week of pregnancy from last menstrual period for fetal sexing (Jurkovic and others 1993). Although they attempted standard cytogenetic studies they failed. The polymerase chain reaction technique (PCR) with Y centromeric primers and fluorescence in-situ hybridization studies (FISH) with alpha satellite repeat probes for X and Y chromosomes, however, allowed for diagnosis of embryonic sex. Two other studies performed by the same group in celomic fluid samples obtained between 7 and 10 weeks gestation demonstrated that successful amplification of a fragment of the human beta-globin gene and sickle cell mutation analysis was possible and that the sensitivity of FISH studies for fetal sexing was 85% (Jurkovic and others 1995; Pandya and others 1995) Atkinson et al. (Atkinson and others 1996), from St. James's University Hospital in Leeds, were the first to report a 65% success rate of cytogenetic analysis on celomic fluid samples obtained between

Santolaya et al.

the 7th and 9th week of gestation. This same group confirmed that DNA studies, including fingerprinting, could be done on celomic fluid samples (Findlay and others 1996). Cruger et al reported a 90% success rate for cultures and cytogenetic analysis in samples obtained between the 6th and 10th week of pregnancy and when the celomic cells were placed in a culture system that included used fibroblast culture medium (Cruger and others 1996). These authors suggested that this method provided with growth factors essential for in-vitro celomic cell growth. More recently these same authors have diagnosed a case of Turner Syndrome at 9 weeks gestation by cytogenetic studies and FISH analysis of chromosomes 18, 13/21,X and Y on uncultured celomic cells (Cruger and others 1997a; Cruger and others 1997b). Makrydimas et al (Makrydimas and others 1997) have diagnosed beta-thalassemia at 7 weeks gestation via celocentesis in couples known to carry specific mutations using the allele specific PCR technique. Interestingly, these authors excluded maternal contamination by demonstrating the expected normal allelic distribution of the parental apolipoprotein B (ApoB) gene in analyzed celomic cells. This group has also recently reported on paternity testing at 7-9 weeks gestation by analyzing the segregation pattern of the paternal and maternal thrombopoietin (TPO) and ApoB alleles in celomic cells (Makrydimas and others 2004). Lau et al have also reported a 91% successful determination of fetal gender using Y-sequence-specific PCR amplification in celomic fluid samples (Lau and others 1998). These authors, however, were concern with the 1 false positive and the 2 false negative results of their study and related them to the possible maternal cell contamination and to the insufficient sample size. Jauniaux et al have used a QF-PCR assay in DNA extracted from celomic cells to test for X,Y,21,18 and 13 chromosomal markers (Jauniaux and others 2003). In this study, the prenatal detection of fetal gender was possible, however, in half of the celomic samples the autosomal primers also amplified maternal DNA and it was by the use of a multiplex PCR assay and maternal blood and chorionic tissue samples that differentiation of fetal from maternal amplification patterns was possible.

We chose to attempt to culture and perform chromosomal studies on the extra-embryonic celomic cells present in 2 mL of celomic fluid obtained at 40 days of primate embryonic development. We used two different sampling techniques, two different needle gauges and intended for the pregnancies to continue to term. to determine if chromosomal studies cytogenetic analysis was possible could be performed using a sample that would pose a relatively small risk to the pregnancy. We used a non-human time-pregnant primate model because our intention was to allow for the pregnancy to continue after the celocentesis procedure. We performed the studies at about 40 days gestation because at this gestational age the proportion of the gestational sac occupied by the extra-embryonic celomic cavity is approximately 50% making the celocentesis procedure technically feasible (Santolaya-Forgas and others 1998b; Santolaya-Forgas and others 1997). Our results suggests that cytogenetic analysis can be performed in primates during the 5th week post-fertilization using 2 mL extra-embryonic celomic fluid. In addition, this preliminary data suggests that keeping the extra-embryonic cells together at the time cultures are initiated may be an important determinant for obtaining successful cultures and karyotypes. This study confirms that the number of living cells in the celomic cavity is very limited and, that the length of the cultures before standard cytogenetic analysis can be performed is relatively long.

Our animal model allowed for the use of two alternative ultrasound guided techniques for performing the celocentesis procedure. This limited series suggests that the trans-abdominal route may be safer than the trans-vaginal route. However, consideration of these alternative routes for celocentesis may only be possible in our model due to the thin abdominal wall of these animals which permits an easy transabdominal ultrasonographic identification of the amniotic and yolk sacs.

In conclusion, previous studies as well as ours suggest: 1) that there are living cells in the extra-embryonic celomic fluid of primates and, 2) that prenatal diagnosis of genetic disorders using celomic fluid is possible even at 40 days of embryonic development. The authors would like to encourage others on using this animal model because it constitutes an excellent clinical

Santolaya et al.

simulator not just for development of the celocentesis as a diagnostic procedure but also for attempting *in-utero* gene therapy. The authors feel that significant improvements in our understanding of the biology of the cells present at 5 weeks post-fertilization in celomic fluid is needed to allow for the rational modifications in culture conditions that will expedite cell growth and produce reliable prenatal genetic studies for clinical use.

TABLE 1

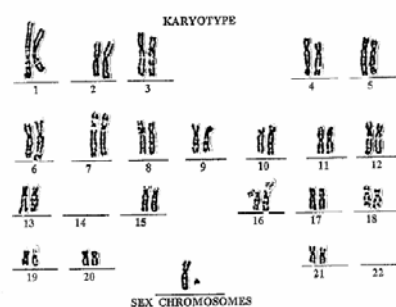
N° of samples	Weeks	Volume mL (range)	Procedure	Type Studies	Diagnosis	First Author and Year
30	8 - 10	3 – 8.3	Vaginal	Cytogenetic (n=10) FISH (n=10) PCR (n=10)	Fetal sexing	(Jurkovic and others 1993)
58	7 - 10	0.5 – 2.5	Vaginal	PCR	Sickle cell anemia	(Jurkovic and others 1995)
32	7 - 10	ND	Vaginal	FISH	Fetal sexing	(Pandya and others 1995)
20	8 - 11	5.5 (mean)	Vaginal	Cytogenetic	Karyotype	(Atkinson and others 1996)
30	6 - 10	1.5 - 10	Vaginal	Cytogenetic	Karyotype	(Cruger and others 1996)
25	7 - 10	3 – 10	Vaginal	Fluorescent PCR	Fetal sexing Single gene defect (Cystic Fibrosis) DNA fingerprints	(Findlay and others 1996)
1	9	ND	Vaginal	Cytogenetic	Turner Syndrome	(Cruger and others 1997b)
26	6 -10	0.5 - 10	Vaginal	FISH	Chromosomes X, Y, 18, and 13/21	(Cruger and others 1997a)
4	7 - 9	1	Vaginal	PCR	Beta-Thalassemia	(Makrydimas and others 1997)
35	6 - 10	0.5 – 3	Vaginal	PCR	Fetal sexing	(Lau and others 1998)
17	ND	ND	Vaginal	QF-PCR	Chromosomes X, Y, 21, 18 and 13	(Jauniaux and others 2003)
20	7 - 9	2 - 3	Vaginal	PCR	Paternity testing (TPO and Apo B)	(Makrydimas and others 2004)

ND: not described.

TABLE 2

Animal	ECF (ml)	Procedure (Needle size)	Medium	Container	Days	Karyotype Outcome
5906	2	Vaginal (18G)	A + used M	Flaskett	20	42,XY Alive Male
6038	2	Vaginal (18G)	A + used M	Flaskett	-	Failure Aborted
5907	2	Vaginal (17G)	A + used M	Flaskett	-	Failure Aborted
6111	2	Vaginal (18G)	A + used M	Flaskett	20	42,XX Aborted
2685	2	Abdominal (20G)	A	Petri	18	42,XX Alive Female
6145	2	Abdominal (20G)	A	Petri	20	42,XY Alive Male
6762	1.5	Abdominal (20G)	A	Petri	16	42,XX Alive Female
2997	2.5	Abdominal (20G)	A	Petri	-	Failure
X894	1	Abdominal (20G)	A	Petri	-	Failure

FIGURE 1



Santolaya et al.

Table 1 Summary of prenatal diagnostic procedures performed via celocentesis. FISH= fluorescence in-situ hybridization. PCR= polymerase chain reaction; QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase chain reaction.

Table 2 Summary of experiments performed in a non-human time pregnant primate model. In-vitro growths of extracelomic cells for chromosomal studies were performed using extra-embryonic celomic cells. ECF= extracelomic fluid; A= amniomax; M= used fibroblast growth medium.

Figure 1 Images of Carnegie stage 7 to 23 of Human and Baboon embryonic development showing Gestational Age, CRL and Fetal Heart Rate for each stage and embryo.

Figure 2 Celomic fluid 42,XY karyotype from animal 6145 and the computer allocation of the chromosomes on a human ideogram.

REFERENCES

- Atkinson G, Rane V, Linton G, Campbell J. 1996. Early prenatal diagnosis of fetal aneuploidy using coelomic fluid. *Early Hum Dev* 47 Suppl:S103-4.
- Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. 1996. Early prenatal diagnosis: standard cytogenetic analysis of coelomic cells obtained by celocentesis. *Prenat Diagn* 16(10):945-9.
- Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. 1997a. Quantitative evaluation of fluorescence in situ hybridization (FISH) signals in uncultured coelomic cells. *Prenat Diagn* 17(7):635-42.
- Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. 1997b. Turner's syndrome 45,X found by celocentesis. *Prenat Diagn* 17(6):588-9.
- Findlay I, Atkinson G, Chambers M, Quirke P, Campbell J, Rutherford A. 1996. Rapid genetic diagnosis at 7-9 weeks gestation: diagnosis of sex, single gene defects and DNA fingerprint from coelomic samples. *Hum Reprod* 11(11):2548-53.
- Goncalvez LF, Romero R, Munoz H, Gomez R, Galasso M, Sherer D, Cohen J, Ghezzi F. 1998. Amniocentesis. In: Lemery JS-FaD, editor. *Interventional Ultrasound in Obstetrics, Gynaecology and the Breast*. 1^o ed: Blackwell Science Inc. p 60 - 90.
- Jauniaux E, Cirigliano V, Adinolfi M. 2003. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Reprod Biomed Online* 6(4):494-8.
- Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Mitchell M, Lees C, Layton M. 1995. Detection of sickle gene by celocentesis in early pregnancy: a new approach to prenatal diagnosis of single gene disorders. *Hum Reprod* 10(5):1287-9.
- Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Pandya P, Cardy DL, Nicolaides KH. 1993. Celocentesis: a new technique for early prenatal diagnosis. *Lancet* 341(8861):1623-4.
- Kowalski W, Pak SC, Parsons M, Diveky L, Santolaya J, Wilson L. 1995. Inhibition of nocturnal oxytocin release and uterine contractions by morphine in the pregnant baboon. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* Volume 2(Issue 2):Page 272.
- Lau TK, Fung TY, Wong YF, Fung HY. 1998. A study of fetal sex determination in coelomic fluid. *Gynecol Obstet Invest* 45(1):16-8.
- Lemery DJ, Santolaya-Forgas J, Wilson L, Jr., Bieniarz A, Warsof SL. 1995. A non-human primate model for the in utero chronic catheterization of the umbilical vein. A preliminary report. *Fetal Diagn Ther* 10(5):326-32.
- Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. 2004. Prenatal paternity testing using DNA extracted from coelomic cells. *Fetal Diagn Ther* 19(1):75-7.
- Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. 1997. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by celocentesis. *Mol Hum Reprod* 3(8):729-31.

Santolaya et al.

- Pandya PP, Cardy DL, Jauniaux E, Campbell S, Nicolaides KH. 1995. Rapid determination of fetal sex in coelomic and amniotic fluid by fluorescence in situ hybridisation. *Fetal Diagn Ther* 10(1):66-70.
- Santolaya Forgas J, León Luis JA, Hikman T, Gimple T, Mehendale R. 2002. The effect of hyperglycemia on maternal-fetal arterial pH, pO₂ and pCO₂ in the baboon model. *American Journal Obstetrics and Gynecology* Volume 187(part 2):Number 6. S62.
- Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J. Celocentesis y su utilización en el diagnóstico prenatal, conocimiento de la dinámica de líquidos en el embarazo temprano y tratamiento intrauterino utilizando células madre progenitoras; 2002; Madrid.
- Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J, D'Ancona RL, Morgan J, Kauffman RP. 2003a. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 18(4):262-9.
- Santolaya-Forgas J, De León-Luis JA, Pinkston J, Siddiqui A. Specific and degenerative primers for Rh D/CE blood type could be a way for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells in baboon model; 2003b; Washington. Society for Gynecologic Investigation. p A89-A204.
- Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, Vengalil S, Kushwaha A, Wilson L, Fortman J. 1998a. Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 179(5):1124-7.
- Santolaya-Forgas J, Hewitt T, Mc Corquodale M, Shen Z, De Christopher P. ABO/Rh(D) status, karyotype and FISH with human specific X and Y probes: Relatively simple ways for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells in the baboon model; 2000. p 400.
- Santolaya-Forgas J, Hewitt T, Shen Z, Mc Corquodale M. Preliminary report on technical issues concerning the in-vitro growth of extracoelomic cells for chromosomal studies using the pregnant baboon model.; 2001; Vienna, Austria. *European Journal of Human Genetics*. p 221.
- Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Kushwaha A, Bieniarz A, Fortman J. 1998b. Assessment of the risk of fetal loss after the celocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 13(4):257-60.
- Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Meyer W, Fortman J. 1997. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 43:323-8.
- Wagner RJ. 1998. Chorionic villous sampling. In: Lemery JS-FaD, editor. *Interventional Ultrasound in Obstetrics, Gynaecology and the Breast*. 1^o ed: Blackwell Science Inc. p 45-59.
- Wilson L, Jr., Parsons MT, Flouret G. 1991. Forward shift in the initiation of the nocturnal estradiol surge in the pregnant baboon: is this the genesis of labor? *Am J Obstet Gynecol* 165(5 Pt 1):1487-98.

Juan De Leon-Luis M.D. and Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.

Biochemical composition of the extra-embryonic celomic fluid: a catalog based on percentage differences with maternal serum paired samples.

Juan De Leon-Luis M.D. and Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.

Amarillo Women's Health Research Institute. Texas Tech University Health Sciences Center.
1400 Coulter. Amarillo, TX 79106. USA.

Reprint request and correspondence:

Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.

Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound

Department of Obstetrics and Gynecology

Texas Tech University Health Sciences Center

1400 Coulter. Amarillo, TX 79106.

Telephone: 806-3544608; FAX: 806-354-5516

jsf@ama.ttuhs.edu

Acknowledge: This work was supported by a grant from Amarillo Women's Health Research Institute. Dr. Juan A. De Leon-Luis is supported in part by a Grant from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (BEFI 02/9305).

ABSTRACT

OBJECTIVE: Ultrasound has allowed for an unprecedented understanding of the in-vivo human development. During the first trimester of pregnancy the ultrasound guided celocentesis procedure has also permitted the analysis of the extra-embryonic celomic fluid. Our objectives were to produce a catalog of solutes that have been measured in paired maternal and celomic fluid samples and to calculate the gradients that exist between maternal serum and the extra-embryonic celomic compartment.

STUDY DESIGN: We have conducted a MEDLINE and PUBMED literature search from January 1990 through March 2004 using the words coelomic fluid, celomic fluid, celocentesis, celocentesis and maternal serum. The following information was extracted from these publications: gestational age at sampling, number of samples, mean concentration of the solute in maternal serum and extra-embryonic celomic fluid in normal pregnancies, authors and year of publication. The catalog is presented in three tables and two figure format.

RESULTS: We found 73 publications with the key words and selected 42 in which paired maternal serum and celomic fluid samples were reported. We constructed a catalog of 93 solutes. Table 1 and figure 2 show solutes that have been described with a (+/- 30%) difference between in maternal serum and extra-embryonic celomic fluid. Table 2 shows solutes for which a concentration greater than 30% could be noted in the extra-embryonic celomic fluid reflecting that the major site of productions is within the gestational sac or that the chorio-decidual membrane allows for transport from the mother against gradient. Table 3 shows solutes for which the concentration is greater that 30% in maternal serum reflecting that the maternal compartment is the major site of production for that solute and that its size is most likely the factor that does not allow for the free transfer to the extra-embryonic celomic fluid.

CONCLUSION: This review article provides further insights into the biochemical and biophysical dynamics occurring between maternal serum and the extra-embryonic celomic fluid in ongoing pregnancies. This data suggests that the biological function of the extra-embryonic celomic fluid depends on the proper function of the chorio-decidual membrane which surrounds the gestational sac.

Key words: First trimester ultrasound. Gestational sac. Extra-embryonic celom. Celocentesis.

INTRODUCTION:

Celome could mean “contained within a cavity”. The extra-embryonic celome is formed within the extra-embryonic mesoderm. The boundaries of the extra-embryonic celomic cavity are delineated by the cytotrophoblastic layer in the outside and the yolk and amniotic sac in the inside. By the end of the 14th week of pregnancy the amniotic sac has obliterated the extra-embryonic celome 1.

During the 1970s and most of the 1980s the extra-embryonic celome was viewed as a virtual space which was most of the times ignored by ultrasonographers. Due to this, amniocentesis performed very early in pregnancy provided conflicting results regarding the composition of the amniotic fluid 2,3. During the late 1980s and 1990s transvaginal ultrasound facilitated the recognition of all of the extra-embryonic structures (Figure 1) and the development of a specific sampling procedure from each of these compartments. The optimal time for sampling extraembryonic celomic fluid, the reproducibility of the celocentesis technique and possible applications have been reported both in humans and in the non-human primate model 1,4-9. Briefly, the celocentesis procedure has been used for development of very early techniques for the prenatal diagnosis of genetic disorders and for the injection of hematopoietic stem cells into the extra-embryonic celomic space with the intention of creating micro xenographs in the pre-immune embryo (**si quieres la actual la meto cuando nos den el libro.....Ref...Nuestras ACMG2004**).

Our overall objective in this study was to gain further insight into the biological composition of the extra-embryonic celomic fluid to allow for comparisons with available culture mediums. Our specific aims were: 1) to produce a catalog of all solutes that have been measured in paired maternal and celomic fluid samples, 2) to calculate the percentage difference that may exist between the maternal serum and the extra-embryonic celomic compartment and, 3) to speculate on a possible mechanisms that could lead to the presence of these gradients.

MATERIAL AND METHODS

We have conducted a MEDLINE and PUBMED literature search from January 1990 through March 2004 using the words coelomic fluid, celomic fluid, celocentesis, celocentesis and maternal serum. The following information was extracted from these publications: number of paired maternal serum and celomic fluid samples, gestational age at sampling, mean concentration of the solute in normal pregnancies, authors and year of publication. Normal values and percentage differences between the maternal serum and the extra-embryonic celomic fluid compartments for studied solvents were then presented in tables and figures format.

RESULTS

We found 73 publications with the key words and selected 42 in which paired maternal serum and celomic fluid samples were reported. We constructed a catalog of 94 solutes. The catalog is presented in a three table and two figure format based in an arbitrary classification which depends on the concentration of solutes and existing gradient between compartments.

Table 1 and Figure 2 show solutes that have been described in equilibrium ($\pm 30\%$) in maternal serum and extra-embryonic celomic fluid.

Table 2 shows solutes for which a gradient greater than 30% has been noted between the extra-celomic fluid and maternal serum reflecting that the major site of production is within the gestational sac or that the chorio decidual membrane allows for active transport from the mother.

Table 3 shows solutes for which a greater than 30% concentration has been noted in maternal serum reflecting that the major site of production is the maternal compartment at these gestational ages.

Figure 3 depicts in 15% incremental gradients all solutes described in Tables 2 and 3.

DISCUSSION

In this study we present a catalog of solutes that have been measured in paired samples obtained from maternal serum and extra-embryonic celomic fluid. This review article provides further insights into the biochemical composition of the extra-embryonic celomic fluid as well as on the biophysical dynamics occurring between maternal serum and the celomic fluid in ongoing pregnancies. Figure 2 depicts the existing gradients between the solutes described in Table 1 and demonstrates that this category is mainly composed by electrolytes, glucose, peptides such as activin A and Erythropoietin and some drugs. Table 2 shows solutes mainly produced within the gestational sac or that have passed by active transport from the mother. Most of the solutes from this category are hormones, essential and non-essential aminoacids, vitamins and a mixed bag of substances which includes soluble TNF, PP14, $\beta 2$ -microglobulin, Interleukin-6, IGFBP-1, lactate and Phosphate. Table 3 shows solutes mainly present in maternal serum at these gestational ages. The molecular weight of these solutes may not allow for the free transfer to the extra-embryonic celomic fluid. This category includes proteins, hormones, cytokines and growth factors, binding proteins, vitamins, Iron and Immunoglobulins.

Semi-permeable membranes are membranes with relatively uniform pore size that reject any solute particle with a molecular weight $>30,000$ d. Osmosis is the transudation of fluid through a semi-permeable membrane that separates solutions of differing concentrations of solutes. Osmolality is an expression of the total concentration of dissolved particles in a solution without regard for the particle size, density, configuration, or electrical charge. Crystalloid and colloid refer respectively to solute particles that are smaller or larger than an arbitrarily determined particle molecular weight, which is usually 30,000 d. Osmotic pressure is a relative characteristic of a solution with respect to pure solvent or to another solution. Actual pressure is calculated when colloid particles are in differing concentrations in solutions separated by a semi-permeable membrane. Semi-permeable membranes in biological systems work both ways and may allow for solute gradients depending on the size of the solute and site of the membrane in which a solute is secreted¹⁰. Several lines of evidence summarized in the three tables and in the two figure suggest that the chorio-decidual membrane behaves biologically as a semi-permeable membrane: low molecular weight solutes are in equilibrium in maternal serum and extra-embryonic celomic fluid (Table 1, Figure 2), while high molecular weight solutes demonstrate a gradient difference of at least 30% (Tables 2 and 3, Figure 3). Although these data did not allow for determination of changes gradients as gestational age advances, we speculate that the net

flow of solvent and crystalloids across the chorio-decidual membrane during the first trimester of pregnancy may be dependent on the counteraction of osmotic and hydrostatic pressures within the maternal and extra-embryonic celomic compartments. Further studies are required to determine if the celomic fluid composition at any given time reflects the physiologic needs of the contents of the gestational sac.

In summary, several lines of evidence presented in this manuscript suggest that the extra-embryonic celomic fluid is biologically important during the early development of humans. In addition, this data suggests that the biological function of the extra-embryonic celomic fluid depends on the proper function of the chorio-decidual membrane which surrounds the gestational sac. The chorio-decidual membrane appears to behave biologically as a semi-permeable membrane which allows for passive exchange of solvent and crystalloids, such as electrolytes and sugars while it also demonstrates selective differences in the gradients for colloid particles such as proteins. Active transport and biochemical gradients may allow for development of specific reservoirs for maintaining normal embryonic development. Osmometry gradients, on the other hand, may be important to physically maintain the gestational sac.

TABLES AND FIGURES

Figure 1.

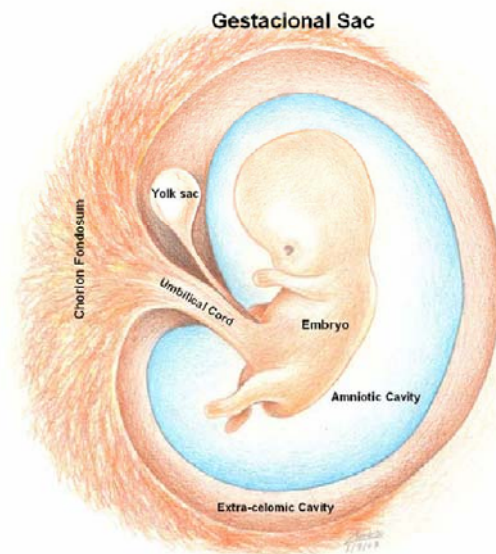


Table 1. Solutes present in Equilibrium ($\pm 30\%$) in Maternal Serum and Extra-Embryonic Celomic Fluid

VARIABLE	UNITS	MS MEAN	ECF MEAN	GA at sampling (Weeks)	Nº	REFERENCE.
Inulin	(mg/mL)	6.9	4.8	8-11	9	25
Glucose	(mmol/L)	3.4	2.7	7-14	55	17
Fentanyl	(ng/mL)	1.2	1.1	7-14	48	23,24
Serine	(mmol/L)	126	116	7-11	17	11
Potassium	(mmol/L)	4.1	3.8	5-13	30	19
Sodium	(mmol/L)	135.9	130.9	5-13	30	19
Tryptophan	(mmol/L)	30	29	7-11	17	22
Erythropoietin	(mIU/mL)	15.4	15.45	7-12	20	21
Chloride	(mmol/L)	105	107.5	7-12	34	15,17
Creatinine	(μ mol/L)	50.3	52.4	5-13	34	15,19,20
MCP-1	(nmol/L)	142.6	151.5	8-11	27	18
Calcium	(mmol/L)	2.3	2.52	7-12	40	13-17
Activin A	(ng/mL)	0.42	0.535	8-11	50	13,14
IGFBP-2	(μ g/L)	123	167	6-12	21	12
Glycine	(μ mol/L)	175	251	7-11	17	11

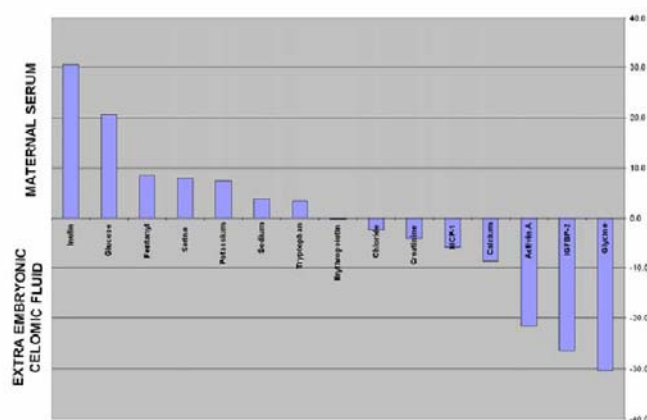
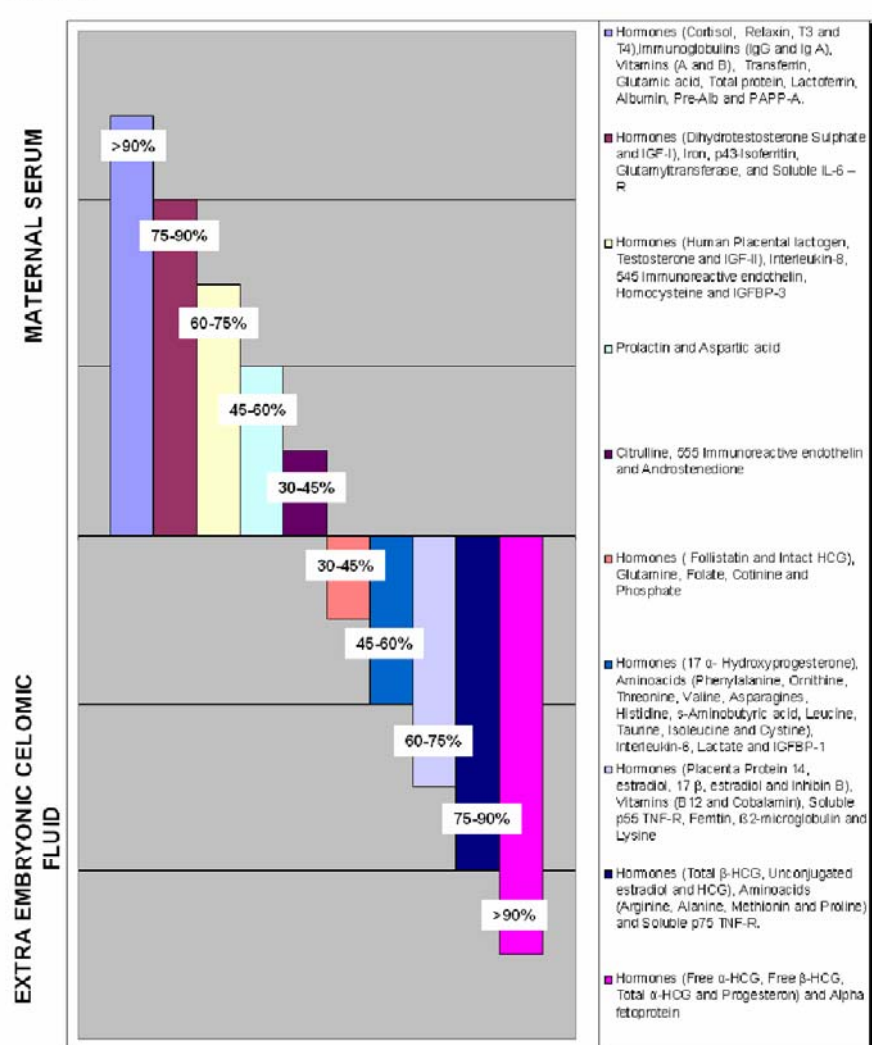
Figure 2. Solutes with Gradients ($\pm 30\%$) in Maternal Serum and Extra-Embryonic Celomic Fluid

Table 2. Solutes with a Greater than 30% concentration in Extra-Embryonic Celomic fluid than Maternal Serum.

VARIABLES	UNITS	MS MEAN	EEC MEAN	GA at sampling (weeks)	N	REFERENCES.
Free α -HCG	(mIU/mL)	69.6	122495	7-12	18	²⁶
Free β -HCG	(mIU/mL)	48.2	1398	7-12	23	^{26,27}
Total α -HCG	(mIU/mL)	68232	1336656	7-8	5	²⁷
Alpha fetoprotein	(kIU/L)	1.4	21.8	8-14	30	¹⁹
Progesteron	(pg/mL)	69.7	877	5-7	25	³⁰
Vitamin B12	(ng/mL)	405	3680	9-12	22	²⁸
Soluble p55 TNF-R	(ng/mL)	0.54	4.52	8-10	21	²⁹
Cobalamin	(ng/mL)	427	3162	9-12	22	²⁸
Placental Protein 14	(ng/L)	642	4416	8-12	27	³⁰
Oestradiol 17 β	(nmol/L)	4.23	25.8	8-12	12	³¹
Oestradiol	(pg/mL)	4448	26978	5-7	25	³⁰
Ferritin	(μ g/L)	49	287	7-13	36	³²
β 2-microglobulin	(mg/L)	0.9	4.7			³³
Lysine	(μ mol/L)	141	703	7-11	17	³⁴
Inhibin B	(pg/mL)	5.94	24.32	8-10	23	³³
Arginine	(μ mol/L)	54	204	7-11	17	³⁴
Alanine	(μ mol/L)	247	742	7-11	17	³⁴
Methionine	(μ mol/L)	16	47	7-12	40	^{11,35}
Total β -HCG	(kIU/mL)	141.5	410	7-12	16	³⁶
Proline	(μ mol/L)	104	289	7-11	17	³⁴
Soluble p75 TNF-R	(ng/mL)	1.71	4.72	8-10	21	²⁹
Unconjugated oestradiol	(nmol/L)	1.0	2.6	8-12	27	³⁰
HCG	(IU/L)	67.3	174	5-13	30	¹⁹
Phenylalanine	(μ mol/L)	55	130	7-11	17	³⁴
Ornithine	(μ mol/L)	48	112	7-11	17	³⁴
Threonine	(μ mol/L)	124	289	7-11	17	³⁴
Valine	(μ mol/L)	174	403	7-11	17	³⁴
Asparagines	(μ mol/L)	44	101	9-12	17	³⁴
Histidine	(μ mol/L)	75	170	7-11	17	³⁴
s-Aminobutyric acid	(μ mol/L)	15	33	7-11	17	³⁴
Interleukin-6	(pg/mL)	40	87.5	7-12	16	³⁴
Leucine	(μ mol/L)	104	221	7-11	17	³⁴
17 α Hydroxyprogesterone	(nmol/L)	16	33.3	8-12	12	³¹
Taurine	(μ mol/L)	92	191	7-11	17	³⁴
Lactate	(mmol/L)	0.3	0.6	7-14	55	¹⁷
Isoleucine	(μ mol/L)	51	101	7-11	17	³⁴
IGFBP-1	(μ g/L)	76	150	6-12	21	³²
Cystine	(μ mol/L)	47	91	7-11	17	³⁴
Follistatin	(pg/mL)	6.35	11.72	8-11	27	³⁴
Glutamine	(μ mol/L)	424	694	7-11	17	³⁴
Folate	(μ g/mL)	6.2	9.9	9-12	22	²⁸
Intact HCG	(kIU/mL)	157	245	7-12	16	³⁶
Cotinine	(ng/mL)	72	108	7-11	23	³⁷
Phosphate	(mmol/L)	1.10	1.61	7-12	32	^{15,17}

Figure 2.



REFERENCES

1. Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J, D'Ancona RL, Morgan J, Kauffman RP. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther.* 2003;18:262-269
2. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Campbell S, Collins WP, Ooms HA. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod.* 1994;9:161-166
3. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991;98:866-870
4. Jeanty P, Renoy P, Van Kerkem J, Dagnelie J, Struyven J. Ultrasonic demonstration of the amnion. *J Ultrasound Med.* 1982;1:243-247
5. Soothill PW, Nicolaides KH, Rodeck CH, Campbell S. Amniotic fluid and fetal tissues are not heated by obstetric ultrasound scanning. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987;94:675-677
6. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by coelocentesis. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:729-731
7. Makrydimas G, Kaponis A, Skentou C, Lolis D. Short-term safety of celocentesis for the mother and the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002;19:243-245
8. Makrydimas G, Lolis D, Georgiou I, Navrozoglou I, Nicolaides KH. Feto-maternal bleeding following coelocentesis. *Hum Reprod.* 1997;12:845-846
9. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Pandya P, Cardy DL, Nicolaides KH. Coelocentesis: a new technique for early prenatal diagnosis. *Lancet.* 1993;341:1623-1624
10. Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, Vengalil S, Kushwaha A, Wilson L, Fortman J. Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1124-1127
11. Jauniaux E, Gulbis B, Gerlo E, Rodeck C. Free amino acid distribution inside the first trimester human gestational sac. *Early Hum Dev.* 1998;51:159-169
12. Miell JP, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:343-349
13. Luisi S, Battaglia C, Florio P, D'Ambrogio G, Taponeco F, Santuz M, Genazzani AR, Petraglia F. Activin A and inhibin B in extra-embryonic coelomic and amniotic fluids, and maternal serum in early pregnancy. *Placenta.* 1998;19:435-438
14. Riley SC, Balfour C, Wathen NC, Chard T, Evans LW, Groome NP, Wallace EM. Follistatin and activin A in extra-embryonic coelomic and amniotic fluids and maternal serum in early pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13:2624-2628
15. Campbell J, Wathen N, Macintosh M, Cass P, Chard T, Mainwaring Burton R. Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992;99:563-565
16. Wathen NC, Delves HT, Campbell DJ, Chard T. The coelomic cavity--a reservoir for metals. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1884-1888
17. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Collins WP, Zaidi J, Campbell S. Investigation of the acid-base balance of coelomic and amniotic fluids in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170:1365-1369

18. Denison FC, Riley SC, Wathen NC, Chard T, Calder AA, Kelly RW. Differential concentrations of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 within the fluid compartments present during the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13:2292-2295
19. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Gervy C, Ooms HA, Campbell S. Biochemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1991;78:1124-1128
20. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Schaaps JP, Campbell S, Meuris S. Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod.* 1993;8:782-787
21. Campbell J, Wathen N, Lewis M, Fingerova H, Chard T. Erythropoietin levels in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992;99:974-976
22. Jauniaux E, Sherwood RA, Jurkovic D, Boa FG, Campbell S. Amino acid concentrations in human embryological fluids. *Hum Reprod.* 1994;9:1175-1179
23. Shannon C, Jauniaux E, Gulbis B, Thiry P, Sitham M, Bromley L. Placental transfer of fentanyl in early human pregnancy. *Hum Reprod.* 1998;13:2317-2320
24. Cooper J, Jauniaux E, Gulbis B, Quick D, Bromley L. Placental transfer of fentanyl in early human pregnancy and its detection in fetal brain. *Br J Anaesth.* 1999;82:929-931
25. Jauniaux E, Lees C, Jurkovic D, Campbell S, Gulbis B. Transfer of inulin across the first-trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:33-36
26. Jauniaux E, Gulbis B, Nagy AM, Jurkovic D, Campbell S, Meuris S. Coelomic fluid chorionic gonadotrophin and protein concentrations in normal and complicated first trimester human pregnancies. *Hum Reprod.* 1995;10:214-220
27. Nagy AM, Jauniaux E, Jurkovic D, Meuris S. Placental production of human chorionic gonadotrophin alpha and beta subunits in early pregnancy as evidenced in fluid from the exocoelomic cavity. *J Endocrinol.* 1994;142:511-516
28. Campbell J, Wathen N, Perry G, Soneji S, Sourial N, Chard T. The coelomic cavity: an important site of materno-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993;100:765-767
29. Opsjon SL, Novick D, Wathen NC, Cope AP, Wallach D, Aderka D. Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol.* 1995;29:119-134
30. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Levels of placental protein 14, human placental lactogen and unconjugated oestriol in extraembryonic coelomic fluid. *Placenta.* 1992;13:195-197
31. Atkinson G, Campbell DJ, Cawood ML, Oakey RE. Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;44:435-440
32. Gulbis B, Jauniaux E, Decuyper J, Thiry P, Jurkovic D, Campbell S. Distribution of iron and iron-binding proteins in first-trimester human pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1994;84:289-293
33. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Gervy C, Ooms HA. Biochemical investigation of fetal renal maturation in early pregnancy. *Pediatr Res.* 1996;39:731-735
34. Jauniaux E, Gulbis B, Hyett J, Nicolaides KH. Biochemical analyses of mesenchymal fluid in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178:765-769

35. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK, van Raaij-Selten B, Chard T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:20-24
36. Iles RK, Wathen NC, Campbell DJ, Chard T. Human chorionic gonadotrophin and subunit composition of maternal serum and coelomic and amniotic fluids in the first trimester of pregnancy. *J Endocrinol.* 1992;135:563-569
37. Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1999;93:25-29
38. Jauniaux E, Mignot TM, Rebourcet R, Robert B, Ferre F. Placental endothelin gene expression and endothelin concentration in fetal fluids of the first trimester gestational sac. *Mol Hum Reprod.* 2000;6:758-762
39. Wathen NC, Campbell DJ, Patel B, Touzel R, Chard T. Dynamics of prolactin in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in early human pregnancy. *Early Hum Dev.* 1993;35:167-172
40. Maymon R, Jauniaux E, Rodeck C, Zaspin L, Moroz C. Comparison of placental isoferitin levels in maternal serum and coelomic and amniotic fluids during first trimester human gestation. *Hum Reprod.* 1998;13:1044-1046
41. Campbell J, Wathen NC, Merryweather I, Abbott R, Muller D, Chard T. Concentrations of vitamins A and E in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1994;71:F49-50
42. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod.* 1995;10:3297-3300
43. Iles RK, Wathen NC, Sharma KB, Campbell J, Grudzinskas JG, Chard T. Pregnancy-associated plasma protein A levels in maternal serum, extraembryonic coelomic and amniotic fluids in the first trimester. *Placenta.* 1994;15:693-699
44. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asuncion M, Gervy C, Contempre B, Morreale de Escobar G. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1768-1777

Joaquin Santolaya-Forgas

Treatment with morphine sulfate can reduce maternal plasma oxytocin levels and uterine contractions after open fetal surgery.

Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.*, Juan De Leon M.D * and Terry Hewitt DVM[#].

Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound. Texas Tech University and Health Science Center at Amarillo(*) and the Biological Resource Laboratory of the University of Illinois at Chicago (#).

Reprint request and correspondence:

Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology

Tech University and Health Science Center

1400 Coulter. Amarillo, TX 79106.

Telephone: 806-3544608; FAX: 806-354-5516

jsf@ama.ttuhs.c.edu

PRECIS

Morphine after open fetal surgery can prevent the immediate post-operative maternal plasma oxytocin rises and uterine contractions.

ABSTRACT

Objective: The most challenging problems related to open fetal surgery remain the control of post-operative preterm labor and the healing of the amniotomy. The purpose of this study was to determine if levels of post-operative analgesia could be related to post-operative maternal plasma oxytocin rises and uterine contractions.

Material and Methods: A non-human time-pregnant primate model (Papio Anubis) for open fetal surgery was established. Under general anesthesia six animals had open fetal surgery. Four catheters, 2 maternal, 1 fetal and 1 in the amniotic cavity, were placed and guided under the skin to the maternal inter-scapulae region. A nylon mesh jacket attached to a flexible stainless steel tether system was placed on the animal, and the catheters were led to an adjacent room where all experimental procedures were performed. From the time of surgery and during the 3 day study period, three animals received prophylactic antibiotics, a bolus of Indocin (5mg) and a bolus of Morphine sulfate (5mg) at 18:00 and 09:00 hours via the maternal femoral artery (*Group I*). The other three animals received the same prophylactic antibiotics and i.v bolus of Indocin (5mg i.v.) at 18:00 and 09:00 hours and a continuous i.v. infusion of Morphine sulfate (1 mg/hour) through out the entire study period (*Group II*). Maternal femoral vein blood samples were collected at 18:00 hours, before lights were turn off, to determine oxytocin plasma levels. Oxytocin was measured by a radioimmunoassay. Uterine activity was continuously recorded and quantified as

Joaquin Santolaya-Forgas

number of contractions (≥ 10 mmHg increase from base line in intra-uterine pressure) per hour (UCs/hr).

Results: Maternal plasma oxytocin levels and number uterine contractions were significantly greater ($p < 0.05$) at any given day in *Group I* than *Group II* animals.

Conclusions: These data suggest that adequate maternal and fetal post-operative pain and stress relief can prevent the excessive post-operative rises in maternal plasma oxytocin levels and uterine contractions. The main effect of continuous morphine treatment after open fetal surgery in the baboons may be a central inhibitory action on maternal and fetal oxytocin release or, an increased oxytocin clearance rate leading to lesser availability of systemic oxytocin for receptor binding. A direct effect of morphine on the myometrium could not be excluded in this study. This information could be useful in preventing pregnancy loss due to post-operative preterm labor and delivery.

Key Words: Tocolytics, fetal surgery, morphine sulfate, hysterotomy, postoperative stress, uterine activity, preterm labor, oxytocin.

INTRODUCTION

Several lines of evidence have suggested that myometrial contractility is modulated by maternal oxytocin, prostaglandins, free calcium levels, estrogen/progesterone ratios, nitric oxide, β -adrenergic activity, other hormones and neural factors ^{1,2}(Lauersen 1972). (Wilson Endocrinology of human gestation 1996...). Recent data is also suggesting that the pathways leading to the initiation and progress of parturition are redundant and interrelated. As examples of these complexities we could use data reported by Sugimoto et al., 1997³, Gross et al., 1998 ⁴ and Imamura et al., 2000 ⁵ demonstrating that both the deletion of the COX-1 gene (cyclo-oxygenase responsible for the synthesis of PGF2a) as well as the deletion of the gene responsible for the PGF2a receptor can prevent normal oxytocin receptor expression at term. Other authors have also reported that vasopressin, hormone synthesized in the supraoptic nucleus and secreted from the posterior pituitary, can act partly via the oxytocin receptor in the uterus and that sensitivity to vasopressin increases at the end of pregnancy. Therefore, vasopressin is likely to also contribute to the generation of uterine contractions and may even compensate for oxytocin in the case of oxytocin deficiency ^{6,7}.

Two types of uterine activity patterns have been described during pregnancy ⁸⁻¹¹. In "unstressed" pregnant animals, contractures are the predominant pattern of uterine activity until a few days before delivery, when a switch from contractures

Joaquin Santolaya-Forgas

to a contraction type pattern is seen. In animal models, this switch frequently occurs at the time the lights are turned off ^{12,13}.

In humans and animals, stress exposure before and during labor can alter the process of parturition by changing the patterns of oxytocin secretion or action and by activating the beta-adrenergic system ¹⁴ (human +1-2 ref).

The aim of this study was to determine if morphine sulphate administration to the mother after open fetal surgery could affect maternal plasma oxytocin levels and uterine contractions. For this purpose we established an animal model and determined whether two different post-surgical morphine dosing regimes for analgesia and "stress" relieve had any effect on short-term maternal plasma oxytocin levels and uterine contractions.

MATERIAL AND METHODS

Surgical instrumentation of animals

The protocol of this study was approved by the Animal Care Committee at the University of Illinois at Chicago. Facilities are accredited by the American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. All animals were obtained, operated and housed individually at the breeding colony of the Biological Resource Laboratory at the University of Illinois at Chicago. Animals were maintained under controlled photoperiod (lights on from 06:00 to 18:00) and temperature (21°C). The animals were fed a daily diet of Purina 5045 High

Joaquin Santolaya-Forgas

Protein Monkey Chow (Ralston Purina Company, St Louis, Mo) pellets and fresh fruits. Water was continuously available.

Six time-pregnant baboons (spontaneous term delivery occurs in baboon at approximately 180 days' gestation) of 18-20 kg were selected based on lack of previous surgical history and an ultrasonographic evaluation that determined fetal viability, location of the placenta and, appropriate fetal measurements (Nomogram UIC). Animals were acclimated to a mesh jacket and a stainless steel tether system connecting the back of the jacket to the cage wall for a week before surgery (Alice King Chatham Medical Art, Los Angeles, CA, USA). Animal were operated on at 130-140 days gestation after a 24-hour period of food deprivation. Animals were initially sedated with an intramuscular injection of ketamine (4mg) and an intravenous injection of Surital (Parke Davis, N.J.) (2mL i.v. of a 2.5% solution). During surgery anesthesia was maintained with Isoflurane 1.5% and N₂O on a 1 to 1 basis. The respiratory rate was maintained between 8 and 12 depending on results of serial maternal intra-operative arterial blood gases. A 5 cm incision was made in the right groin area of the leg just above the external femoral vessels. The vein and artery were dissected free and a 20 gauge polyvinyl catheter (Bolabs Inc., Lake Havasu City, Ariz.) was placed into incisions in the vein and artery so that the tip rested in the vena cava or aorta just above the bifurcation, as determined by the location of the abdominal umbilicus. The catheters were anchored with 3-0 silk suture, filled with heparinized (50 IU/mL) saline solution and exited subcutaneously at the mothers right flank area with tunneling needles (Alice King Chatham Medical Art, Los

Joaquín Santolaya-Forgas

Angeles). The leg incision was closed with a subcutaneous 3-0 Vicryl suture. A 15 cm midline laparotomy was then made just below and lateral to the umbilicus. An intra-operative sterile ultrasonographic evaluation allowed for evaluation of the placental insertion and for positioning the fetus in vertex presentation. A very superficial 10 cm long myometrial purse string (3-0 silk) suture was placed in the lower part of the uterine body. A transverse hysterotomy, avoiding the placenta and within the purse string suture, was then performed and, the fetal occiput and finally the entire head was slowly delivered. The purse string suture was then tightened around the fetal neck to prevent loss of amniotic fluid. The fetal carotid artery was then dissected free and a 23 gauge polyvinyl catheter was placed into an incision made in the artery so that the tip rested just before the entry into the right atrium as determined by the location of the medial end of the clavicle. The catheter was anchored with 3-0 silk suture and filled with heparinized (25 IU/mL) saline solution. After removal of the purse string suture the assistant maintained a slight upward tension (using 4 Allis clamps positioned around the hysterotomy edges which also kept the amniotic membranes in place) while the surgeon flexed and slowly reinserted the fetal head into the uterus using very moderate pressure. Thirty cm of the fetal catheter was left in the amniotic cavity to allow for fetal movements. A 20 gauge polyvinyl catheter, for monitoring intra-amniotic pressure, was also inserted into the uterine cavity. The amnion and inner third of the uterine incision were closed with a 3-0 vicryl running suture without tension and allowing the catheters to come out through the center area of the incision and within 3 cm of each other. Both catheters were then brought to the right

Joaquín Santolaya-Forgas

corner of the incision and a second 3-0 vicryl, imbricating running suture was placed to close the remaining upper two thirds of the uterine incision. The two intra-uterine catheters were then anchored with 3-0 silk to the serosal layer of the uterus and exteriorized via the animal's right flank to meet the catheters coming from the mother's groin. The abdominal fascia was then closed with nylon (0) and the skin incision with a subcutaneous 3-0 vicryl suture. The 4 catheters (2 maternal, 1 fetal and 1 amniotic cavity) were guided under the skin to the maternal inter-scapulae region. All surgeries were completed by 1400 hours. Oxygen was administered to the mother during the recovery period and ultrasound imaging used to monitor for fetal heart rate. The mesh jacket was then placed on the animal and the catheters brought out through the stainless steel tether attached to the jacket. The animals were then brought to the laboratory and placed in his cage. All catheters were brought via the tether outside of the cage and to an adjacent room where all experimental procedures were performed. The 3 intravascular catheters were attached to syringes located on Harvard infusion pumps (Harvard Apparatus Co. Millis, Mass. USA). Throughout the study period an infusion of the heparin solutions described above (18mL/24h in the mother and 5mL/24h in the fetus) were maintained to keep the intravascular catheters patent. The mother also received 0.5 gm/24h of Cefazolin via the arterial line solution and a 15mg bolus of Gentamicin every 12h. The intra-amniotic catheter filled with normal saline was attached to a P23id Gould pressure transducer, and intrauterine pressure changes were recorded on a Model 7 Grass Polygraph (both from Grass Instruments, Quincy, MA, USA). In

Joaquín Santolaya-Forgas

addition, the analog signal of the intrauterine pressure changes was digitized with a Data Translation 2811 H board on a Dell PC computer.

Treatment groups and post-operative evaluations

From the time of surgery and during the 3 day study period, three animals received a bolus of Indocin (5mg) and a bolus of Morphine sulfate (5mg) at 18:00 and 09:00 hours via the femoral artery (*Group I*). The other three animals received the same i.v. bolus of Indocin (5mg i.v.) at 18:00 and 09:00 hours and a continuous i.v. infusion of Morphine sulfate (1 mg/hour) through out the entire study period (*Group II*).

Maternal femoral vein blood samples were collected at 18:00 hours, before lights were turn off, during the 3 days of the study to determine maternal plasma oxytocin levels. After collection, all blood samples were transferred into chilled, heparinized polypropylene collection tubes and centrifuged at 4°C at 1200 *g* for 5 minutes. The plasma was then removed, divided into aliquots, flash-frozen in liquid nitrogen, and stored at -20°C until assay. Oxytocin was measured with a radioimmunoassay as previously described (Mehendale paper). All samples were analyzed for radioactivity in a gamma counter. The intra-and-interassay coefficients of variation are 13% and 16% and the assay sensitivity is 0.6 fmol/tube.

Uterine activity was continuously recorded and analyzed to determine the frequency, mean amplitude, and mean duration of the uterine contractile activity. Number of contractions (elevations ≥ 10 mmHg in intrauterine pressure) per hour

Joaquin Santolaya-Forgas

for each animal was counted during the 3 postoperative days and the average and mean daily value for each group was determined and expressed as uterine contractions per hour (UCs/hr).

Data analysis: The daily's group's mean \pm SEM maternal plasma oxytocin (pg/mL) and uterine contractile activity (Ucs/hr) values across the 3 study days were compared with the Student *t* tests. Level of significance was placed at $P < 0.05$.

RESULT

Group I had an overall significantly greater ($p < 0.05$) mean maternal plasma oxytocin concentration (pg/mL) and number of uterine contractions (UCs/hr) than *Group II* (Table 1).

Figure 1 shows that at any given day of the study period the mean maternal plasma oxytocin levels at 18:00 hours in *Group I* were significantly greater than those of *Group II* ($p < 0.05$).

Figure 2 shows that at any given day of the study period the mean number of uterine contractions per hour in *Group I* were significantly greater than those of *Group II* ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The environments leading to onset of spontaneous labor at term are not well understood and are likely to be different from those occurring when pre-term

Joaquin Santolaya-Forgas

labor is established. Some of our clinical failures in preventing prematurity due to preterm labor may reside in the lack of understanding of the specific environments and mechanism that lead to uterine contractions. Because we do not understand the environments that mediate parturition we can't tailor specific medical treatments to particular patients presenting in true preterm labor.

Briefly, the alternative clinical strategies for the treatment of preterm labor are: 1) maternal hydration to reduce maternal plasma concentration of oxytocin and perhaps to also enhance its physiological clearance rate; 2) oxytocin antagonists and prostaglandins inhibitors to prevent their action at the uterine receptor level^{15,16} (Meddle et al., 2000; Douglas et al., 2001); 3) calcium channel blockers to reduce the entry of free Ca^{2+} into the myometrial cell preventing their capacity to contract¹⁷⁻¹⁹; 4) aromatase inhibitors and progesterone to prevent the unopposed rise in maternal plasma estradiol concentration known to preceding the increases in plasma oxytocin concentration, the switches of myometrial activity from contractures to contractions and the progression till delivery²⁰⁻²³ (PROGESTERONE PAPER NEJM; 5) β -adrenergic agonist, such as ritrodrene, by modulating β -adrenergic action²³ (Cruz and Rudolph, 1986; Cruz et al., 1990)

Obstetricians know that oxytocin is important during the process of labor because: 1) experiments performed in-vitro have demonstrated that oxytocin can lead to the contraction of the smooth muscle of the uterus; 2) studies performed in pregnant women have demonstrated that maternal oxytocin levels increase towards term and during the second stage of labor; 3) oxytocin crosses the placenta since levels are higher in the umbilical artery of newborns delivered

vaginally than those delivered by elective cesarean section and 4) oxytocin is used by the fetus during the process of labor since higher levels are found in the umbilical artery than in the umbilical vein (REF+REFF from book). Although it has been reported that opioids may not affect uterine muscle contractility after spontaneous onset of labor at term ^{24,25}(Thorton), analgesics are known to decrease post-operative metabolic and hormonal stress responses ^{26,27}. The aim of this study was to study in a surrogate model for human pregnancy if morphine administration after open fetal surgery could prevent the short term post-operative preterm labor and if this effect could be related to significant changes in maternal plasma oxytocin concentration. Because we knew that the neurohypophysial oxytocin secretion as well as uterine contractions exhibit diurnal variations during primate gestations, we collected all maternal blood samples at the same time of the day and just before turning-off the lights. We avoided other confounding variables by not using external hormonal manipulations and by the use of the same prostaglandin inhibitor regimen in both groups knowing that trauma to the uterus releases local factors such as prostaglandins that can generate uterine contractions. We also used the same antibiotic prophylactic regimen for prevention of post-operative infection. Our data suggests that *Group I* animals, with incomplete analgesic treatment (half-life of morphine is $2h \pm 1.8$)²⁸, had an acute deregulation of oxytocin secretion or clearance and more uterine contractions than *Group II*. We speculate that a likely mechanism for the increased uterine contractility pattern in *Group I* was an excess of bio-available oxytocin at the myometrial oxytocin receptor level. Once

uterine contractions were initiated neural signals transmitted through the brainstem and olfactory bulb to oxytocin neurons may maintain the increase rate of uterine contractions that has been noted in human trials involving in-utero fetal surgery²⁹⁻³².

Our findings are in agreement with a previous study that suggested that post-operative analgesia could prevent uterine contractions²⁷. Our study methods, however, differ from that study in 3 ways: 1) we operated on the mother and fetus, 2) we used both a prostaglandin inhibitor and prophylactic antibiotics as part of the treatment protocol, 3) we used morphine sulfate and not a synthetic partial opioid receptor agonist.

In conclusion, these data suggest that inadequate maternal and fetal post-operative pain and stress relief can lead to acute elevations in maternal plasma oxytocin levels and to an increase number of uterine contractions. The main effect of continuous morphine treatment after open fetal surgery in the baboons may be a central inhibitory action on maternal and fetal oxytocin release or, an increased oxytocin clearance rate leading to lesser availability of systemic oxytocin for receptor binding. This information could be useful in preventing pregnancy loss due to post-operative preterm labor and delivery. Future studies could be directed to determine if morphine can: 1) modify the placenta capacity to secrete the cystine aminopeptidase which degrades oxytocin, 2) alter oxytocin clearance rate at the level of the kidneys, liver and placenta by increasing the blood flow to these sites³³ (Thorton 1990) and 3) directly act on the uterine muscle preventing uterine contraction since uterine contraction are closely

Joaquín Santolaya-Forgas

dependent on the cytoplasmic concentration of free Ca^{2+} and morphine, as well as other opioid receptor agonist, can decrease the sensitivity to calcium of myofilaments of organs such the heart ^{34,35}.

Acknowledgments: We are indebted to the late Dr. Laird Wilson Jr. for teaching us this animal model and for allowing us to work in his laboratory at the University of Illinois at Chicago from the years 1991 to 2000. We also acknowledge the Department of Obstetrics and Gynecology of the University of Illinois at Chicago for allowing us to use Dr. Wilson's equipment to conduct this study. The authors are grateful to Dr. Ramakrishnan Mehendale M.D.,PhD, from the University of Illinois at Chicago for his technical support. JDL is partly supported by a Grant from the Amarillo Women's Health Research Institute and by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias.

TABLES

Table. 1.

Day \ Mean \pm S.E	GROUP I	GROUP II	GROUP I	GROUP II
	OT (pg/ml)	OT (pg/ml)	(UCs/hr)	(UCs/hr)
DAY 1	42.0 \pm 6.7	2.7 \pm 1	4.1 \pm 0.5	2.7 \pm 0.1
DAY 2	59.3 \pm 38.4	0.69 \pm 0.66	1.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
DAY 3	46.1 \pm 16.7	18.6 \pm 17.8	19.9 \pm 0.9	0.3 \pm 0.1
MEAN FOR STUDY PERIOD	49.13	7.33	8.40	1.27

REFERENCES

1. Wilson L, Jr., Parsons MT, Flouret G. Forward shift in the initiation of the nocturnal estradiol surge in the pregnant baboon: is this the genesis of labor? *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1487-1498
2. Higby K, Xenakis EM, Pauerstein CJ. Do tocolytic agents stop preterm labor? A critical and comprehensive review of efficacy and safety. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:1247-1256; discussion 1256-1249
3. Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science.* 1997;277:681-683
4. Gross GA, Imamura T, Luedke C, Vogt SK, Olson LM, Nelson DM, Sadovsky Y, Muglia LJ. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11875-11879
5. Imamura T, Luedke CE, Vogt SK, Muglia LJ. Oxytocin modulates the onset of murine parturition by competing ovarian and uterine effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R1061-1067
6. Stepke MT, Schwenzer N, Eichhorn W. Vasoconstrictors during pregnancy--in vitro trial on pregnant and nonpregnant mouse uterus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23:440-442
7. Kumaresan P, Subramanian M, Anandaragam PB, Kumaresan M. Radioimmunoassay of plasma and pituitary oxytocin in pregnant rats during various stages of pregnancy and parturition. *J Endocrinol Invest.* 1979;2:65-70
8. Morgan MA, Honnebier MB, Mecnas C, Nathanielsz PW. Cocaine's effect on plasma oxytocin concentrations in the baboon during late pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1026-1027
9. Morgan MA, Silavin SL, Wentworth RA, Figueroa JP, Honnebier BO, Fishburne JI, Jr., Nathanielsz PW. Different patterns of myometrial activity and 24-h rhythms in myometrial contractility in the gravid baboon during the second half of pregnancy. *Biol Reprod.* 1992;46:1158-1164
10. Germain G, Cabrol D, Visser A, Sureau C. Electrical activity of the pregnant uterus in the cynomolgus monkey. *Am J Obstet Gynecol.* 1982;142:513-519
11. Germain G, Lopes P, Cabrol D, Barbe MP, Huneau D, Le Houezec R, Sureau C. A comparison of uterine motility in the pregnant and non-pregnant cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and pregnant woman: a manometric and electromyographic study. *Acta Physiol Hung.* 1986;67:95-115
12. Taylor NF, Martin MC, Nathanielsz PW, Seron-Ferre M. The fetus determines circadian oscillation of myometrial electromyographic activity in the pregnant rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol.* 1983;146:557-567
13. Farber DM, Giussani DA, Jenkins SL, Mecnas CA, Winter JA, Wentworth RA, Nathanielsz PW. Timing of the switch from myometrial contractures to contractions in late-gestation pregnant rhesus monkeys as recorded by myometrial electromyogram during spontaneous term and androstenedione-induced labor. *Biol Reprod.* 1997;56:557-562

14. Laatikainen TJ. Corticotropin-releasing hormone and opioid peptides in reproduction and stress. *Ann Med.* 1991;23:489-496
15. Antonijevic IA, Douglas AJ, Dye S, Bicknell RJ, Leng G, Russell JA. Oxytocin antagonists delay the initiation of parturition and prolong its active phase in rats. *J Endocrinol.* 1995;145:97-103
16. Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *Lancet.* 2002;360:1489-1497
17. Poli E, Merialdi A, Coruzzi G. Characterization of the spontaneous motor activity of the isolated human pregnant myometrium. *Pharmacol Res.* 1990;22:115-124
18. Burnstock G. Autonomic neuroeffector mechanisms in smooth muscle. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* 1984;20:365-392
19. Fazackerley J, Pleuvry BJ. Stimulant action of pethidine on the pregnant rat uterus in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 1987;39:491-492
20. Baguma-Nibasheka M, Mecnas CA, Giussani DA, Nathanielsz PW. Inhibitory effect of iloprost on the contractility of lower uterine segment myometrium from rhesus monkeys in normal-term and androstenedione-induced preterm labor. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7:167-169
21. Giussani DA, Jenkins SL, Winter JA, Tame JD, Nathanielsz PW. Androstenedione treatment of pregnant baboons at 0.7-0.8 of gestation promotes a premature forward shift in the nocturnal maternal plasma estradiol surge relative to progesterone and increases myometrial contraction activity. *Endocrinology.* 2000;141:3296-3303
22. Giussani DA, Jenkins SL, Mecnas CA, Winter JA, Barbera M, Honnebier OM, Nathanielsz PW. The oxytocin antagonist atosiban prevents androstenedione-induced myometrial contractions in the chronically instrumented, pregnant rhesus monkey. *Endocrinology.* 1996;137:3302-3307
23. Mecnas CA, Giussani DA, Owiny JR, Jenkins SL, Wu WX, Honnebier BO, Lockwood CJ, Kong L, Guller S, Nathanielsz PW. Production of premature delivery in pregnant rhesus monkeys by androstenedione infusion. *Nat Med.* 1996;2:443-448
24. Tribalat S, Lewin D, Coltat JC. [Peridural anesthesia with a bupivacaine-fentanyl combination. Effects on uterine contractility]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 1987;16:123-127
25. Lurie S, Feinstein M, Heifetz C, Mamet Y. Epidural analgesia for labor pain is not associated with a decreased frequency of uterine activity. *Int J Gynaecol Obstet.* 1999;65:125-127
26. Anand KJ, Ward-Platt MP. Neonatal and pediatric stress responses to anesthesia and operation. *Int Anesthesiol Clin.* 1988;26:218-225
27. Tame JD, Abrams LM, Ding XY, Yen A, Giussani DA, Nathanielsz PW. Level of postoperative analgesia is a critical factor in regulation of myometrial contractility after laparotomy in the pregnant baboon: implications for human fetal surgery. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:1196-1201
28. Kart T, Walther-Larsen S, Svejborg TF, Feilberg V, Eriksen K, Rasmussen M. Comparison of continuous epidural infusion of fentanyl and bupivacaine with intermittent epidural administration of morphine for postoperative pain management in children. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1997;41:461-465
29. Douglas AJ, Leng G, Russell JA. The importance of oxytocin mechanisms in the control of mouse parturition. *Reproduction.* 2002;123:543-552

30. Douglas AJ, Clarke G, MacMillan SJ, Bull PM, Neumann I, Way SA, Wright DM, McGrory BG, Russell JA. Effects of the kappa-opioid agonist U50,488 on parturition in rats. *Br J Pharmacol.* 1993;109:251-258
31. Luckman SM, Antonijevic I, Leng G, Dye S, Douglas AJ, Russell JA, Bicknell RJ. The maintenance of normal parturition in the rat requires neurohypophysial oxytocin. *J Neuroendocrinol.* 1993;5:7-12
32. Meddle SL, Leng G, Selvarajah JR, Bicknell RJ, Russell JA. Direct pathways to the supraoptic nucleus from the brainstem and the main olfactory bulb are activated at parturition in the rat. *Neuroscience.* 2000;101:1013-1021
33. Kowalski WB, Parsons MT, Pak SC, Wilson L, Jr. Morphine inhibits nocturnal oxytocin secretion and uterine contractions in the pregnant baboon. *Biol Reprod.* 1998;58:971-976
34. Kanaya N, Zakhary DR, Murray PA, Damron DS. Differential effects of fentanyl and morphine on intracellular Ca^{2+} transients and contraction in rat ventricular myocytes. *Anesthesiology.* 1998;89:1532-1542
35. Xiao RP, Spurgeon HA, Capogrossi MC, Lakatta EG. Stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L type Ca^{2+} channel current. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:661-666

Validation of the time-pregnant baboon model for ultrasound guided *in utero* gene therapy in the pre-immune embryo.

Juan De Leon-Luis(1), Roman Wolf (2) and Joaquin Santolaya Forgas (1)

Amarillo Women's Health Research Institute. Texas Tech University and Health Science Center

(1). University of Oklahoma Health Sciences Center (2)

Reprint request and correspondence:

Joaquin Santolaya-Forgas M.D.,Ph.D.

Division of Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound

Department of Obstetrics and Gynecology

Texas Tech University and Health Science Center

1400 Coulter. Amarillo, TX 79106.

Telephone: 806-354-4608; FAX: 806-354-5516

jsf@ama.ttuhsu.edu

Key Words: First trimester ultrasound. Prenatal diagnosis. Embryo. Celome. Yolk sac. Amniotic sac. *In utero* gene therapy.

Abstract

Objective: To determine if the non-human time-pregnant baboon model could be used as a surrogate for human pregnancy for development of ultrasound guided *in utero* gene therapy programs in the pre-immune embryo.

Material and methods: The gestational, amniotic and yolk sacs as well as the embryonic CRL and heart rate were measured ultrasonographically in 18 baboon and 82 human pregnancies in which the date of fertilization could be calculated (\pm 3 days). Ultrasonographic measurements were obtained from both species and then matched using Carnegie stages of embryonic development.

Results: The eighteen time-pregnant baboon pregnancies were evaluated between 35 and 47 days from fertilization. The eighty-two human pregnancies were evaluated between 42 to 58 days post fertilization as calculated by subtracting 15 days from the gestational age determined by CRL measurements. To allow for graphical comparisons of the early Ultrasonographic developments of both species we have constructed 7 figures with plots of measurements matched by Carnegie stages of embryonic development.

Conclusion: this data demonstrates that baboons and humans are ultrasonographically very similar early in pregnancy and therefore, the time-pregnant baboon model is useful for developing early ultrasound guided prenatal diagnostic and therapeutic procedures.

INTRODUCTION

Baboons (*Papio Anubis*) have a similar reproductive systems and placentation to humans and allow as humans for ultrasonographic evaluations and ultrasound guided procedures during early pregnancy¹⁻³. Our aim in this study was to determine if the time-pregnant baboon model could be used as a surrogate for human pregnancy for further development of *in utero* ultrasound guided gene therapy programs. For this purpose, we have compared the ultrasonographic changes occurring during early baboon and human pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

After approval by the University of Oklahoma Animal Care Committee, 18 time-pregnant baboon's with singleton pregnancies at 35 to 47 days post-fertilization were evaluated ultrasonographically. Briefly, all animals were sedated with an intramuscular injection of ketamine (7 mg/kg) and then placed on the examining table for the ultrasound evaluation. After visualization of gestational, amniotic and yolk sacs (GS, AS,YS) the three largest diameters were measured using longitudinal and transverse views. Fetal crown-rump length was also recorded. Embryonic heart rate was determined with the M-mode function of the ultrasonographic equipment.

Eighty-six pregnant women with regular periods, referred for a dating ultrasound, and with singleton pregnancies at 42 to 58 days of development as determined by subtracting 15 days from dates calculated from CRL measurements were also included in the study^{4, 5}. All women had a transvaginal ultrasound examination as previously described⁵. Briefly, all examinations were performed with a set-up making the spatial peak temporal average intensities less than 100 mW/cm². (ATL 5000, 3500 or 3000 with 6.5 MHz transducer). The sonographic measurements were similar to those described for the animal studies and lasted approximately 5 minutes. For the purpose of this study only cases in which we could confirm cardiac activity were included. None of

the patients had clinical or ultrasonographic signs of pathology.

Polaroid pictures from all measurements obtained from baboons and humans were analyzed. We computed the CRL, embryonic heart rate and, the mean diameter of the 3 largest diameters of the GS, AS and YS. The percentage of the gestational sac occupied by the extra-celomic space was calculated according to the formula: $ES\% = \frac{\text{Mean diameter of GS} - \text{Mean diameter of AS}}{\text{Mean diameter of GS}} \times 100$.

SPSS statistical analysis package was used for computing summary statistics and for plotting the data (SPSS Inc for Windows, version 9.0, Chicago, IL., USA).

RESULTS

Table 1 summarizes clinical and ultrasonographic data from baboons and humans. Figure 1 shows when the Carnegie stages of embryonic development are reached in baboons and humans. Figures 2-7 depict the ultrasonographic changes occurring in baboons and humans matched for Carnegie stages of development ⁶ (**5 Carnegie**). These figure formats allow for graphical comparisons of the ultrasonographic embryonic and extra-embryonic development.

DISCUSSION

In utero stem cell transplantation is a potential therapeutic approach for a wide variety of inherited disorders that can be diagnosed prenatally. Tables 2 and 3 summarize clinical data from all the *in-utero* stem cell transplantation studies that have been attempted under ultrasound guidance in large animals or in humans. These tables demonstrate the different gestational ages at which the studies have been performed. Our unit has also been developing an experimental *in-utero* gene therapy program during the last years. We have performed all our experiments in the time pregnant baboon model using human hematopoietic progenitors and always at 38-40 days post-fertilization

(presented at 200 American Society of Human Genetics, 2001 International Fetal Medicine and Surgery Society ; 2002 2nd Minimally-Invasive Fetal Therapy Conference, Tampa, FL; 2002 Fetal Medicine Foundation (UK); 2002 Spanish National Congress of Prenatal Diagnosis; 2003 International Society of Perinatal Obstetricians within the American Society of Maternal Fetal Medicine; 2003 and 2004 Society of Gynecological Investigation; 2004 American College of Medical Genetics) ⁷⁻⁹. Our overall aim is to determine if hematopoietic stem cells injected close to the yolk sac via the celocentesis procedure can allow for development of microchimerisms in the pre-immune embryo (**9pediatría**).

Our aim in this study was to determine if early ultrasonographic development of baboons and humans was similar. The Department of Embryology at the Carnegie Institute of Washington, USA, has a collection of vertebrate embryos in which three dimensional developmental land marks can be identified and used to determine the time in pregnancy at which different vertebrates reach particular developmental stages (**Carnegie**). Our hypothesis is that developmental stages can be used to correct for the range in days that each species takes to reach the particular developmental stage. If we accepted that inter-species embryonic development in vertebrates can be compared using Carnegie stages of development we can use these stages as the common denominator to allow for a graphical comparison of the ultrasonographic changes occurring during the baboon and human embryonic development. It is the author's opinion that the data presented in this study validates the non-human time pregnant baboon model as a surrogate for early human pregnancy. In summary, this study has demonstrated that Carnegie stages of Development could be used to unify interspecies developmental criteria. This study also shows that: 1) baboons and humans are ultrasonographically very similar early in pregnancy; 2) the time-pregnant baboon model is useful for developing new ultrasound guided prenatal diagnosis and therapeutic procedures; 3) the time-pregnant baboon model could prevent early human pregnancy experimentation.

Tables 1

Carnegie Stages		17	18	19	20	21	22	23
Human	Days Post-Fertilization	42	44	48	52	54	55	58
Number Cases		4	8	12	18	15	14	15
CRL	(mm)	12.3	15.1	17.4	20.2	23	25	29.2
GS	(mm)	44.1	47.3	51.2	52.8	57	58.8	61.3
AS	(mm)	3.9	7.3	11	15.4	19.8	23.5	26.2
ES	(%)	91.2	84.6	78.5	70.8	65.3	60.0	57.3
YS	(mm)	4.2	4.6	5	5.6	6	6.1	6.3
HR	(bpm)	160.2	148	141.5	160	157	175	178.5
Baboon	Days Post-Fertilization	35	37	39	41	43	45	47
Number Cases		1	2	3	3	3	3	3
CRL	(mm)	12	13	17.6	18.1	19.2	22.6	26
GS	(mm)	41.35	43.79	46.23	48.67	51.11	53.55	55.99
AS	(mm)	2.86	6.5	10.14	13.78	17.42	21.06	24.7
ES	(%)	93.1	85.2	78.1	71.7	65.9	60.7	55.9
YS	(mm)	3	3.1	3.9	4	4.3	5	5
HR	(bpm)	157	158	162	160	149	179	166

Table 2. US-Guided *in-utero* animal studies using human Hematopoietic Progenitors

MODEL	Gestational Age at experiment (Days)	Length of Gestation (Days)	Human Source AB,ABM,FL,FBM,CB	ENGRAFTMENT (%)	AUTHOR	YEAR
Baboon	85-104	180	FL	33	Shields et al	1995 ¹⁰
Macaque	50-56	165	APB	100	Tarantal et al	2000 ¹¹
Goat	55-65	150	UCB	1-3	Huang et al	2002 ¹²
Sheep	40-45	145	UCB	100	Noia et al	2003 ¹³
Pigs	52	114	UCB	66	Fujiki et al	2003 ¹⁴

FL: Fetal liver; APB: Adult Peripheral Blood; UCB: Umbilical Cord Blood.

Table 3. Historical review of human *in utero* stem cell transplantation.

Disease	GA (weeks)	Method	Tissue	Engraftment	Survival	Autor	YEAR
Rh isimmunization	17	I.V.	Maternal BM	No	Yes	Linch et al.	1986 ¹⁵
Bare Lymphocytes Syndrome	30	I.V.	FL and Thymic cells	Yes	Yes	Touraine et al.	1989 ¹⁶
SCID	28	I.V.	FL	Yes	Yes	Touraine et al.	1991 ¹⁷
SCID	20	I.P. AND I.V.	Maternal BM	No	Elective termination	Diukhan and Golbus	1992 ¹⁸
α Thalassemia	18	I.P.	Maternal BM	Yes	Elective termination		
Chediak-Higashi	19	I.P.	Maternal BM	No	Yes		
β Thalassemia	25	I.P. AND I.V.	Sibling BM	No	Yes	Slavin et al.	1992 ¹⁹
β Thalassemia	18	I.V.	FL	ND	No		
Metachromatic leukodystrophy	37	I.P.	Paternal BM	No	Yes		
Metachromatic leukodystrophy	23	I.V.	Paternal BM	No	Yes		
Rh isimmunization	12	I.P.	Maternal BM	No	Yes	Thilagantan and Nicolaiades	1993 ²⁰
β Thalassemia	14	I.P.	FL	ND	No	Cowan and Golbus	1994 ²¹
Hurler's syndrome	14	I.P.	FL	No	Yes		
α Thalassemia	15, 31	I.P. AND I.V.	FL	No	Yes	Westgren et al.	1996 ²²
β Thalassemia	18	I.V.	FL	No	Yes		
Sickle Cell Anemia	13	I.P.	FL	No	Yes		
X-linked SCID	14	I.P.	FL	yes	Yes		
X-linked SCID	16, 17.5 and 18.5	I.P.	Paternal BM	Yes	Yes	Flake et al.	1996 ²³
X-linked SCID	21, 22	I.P.	Paternal BM	Yes	Yes	Wengler et al.	1996 ²⁴
SCID	23, 24	I.P.	Paternal BM	Yes	Yes		
Chronic Glaucomatous Disease	17, 21	I.P.	FL	ND	No	Touraine	1996 ²⁵
Chediak-Higashi	19	I.P.	Maternal BM	No	Yes	Flake and Zanjani	1997 ²⁶
Globoid cell Leukodystrophy	14	I.P.	Paternal BM	Yes	No	Bambach et al.	1997 ²⁷
α Thalassemia	13, 19 and 24	I.P.	Paternal BM	Yes	Yes	Hayward et al.	1998 ²⁸
β Thalassemia		I.P.	Paternal BM	No	Yes	Monni et al.	1998 ²⁹
Globoid cell Leukodystrophy	13	I.P.	Paternal BM	No	Yes	Leung et al.	1999 ³⁰
Globoid cell Leukodystrophy	13	I.P.	Paternal BM	No	Yes		
X-linked SCID	14	I.P.	FL	Yes	Yes	Westgren M et al	2002 ³¹

GA: Gestational age at the time of transplant; SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disease; I.P.: Intra-peritoneal; I.V.: Intra-vascular; BM: Bone Marrow; FL: Fetal Liver; ND: Not determined

Fig 1.

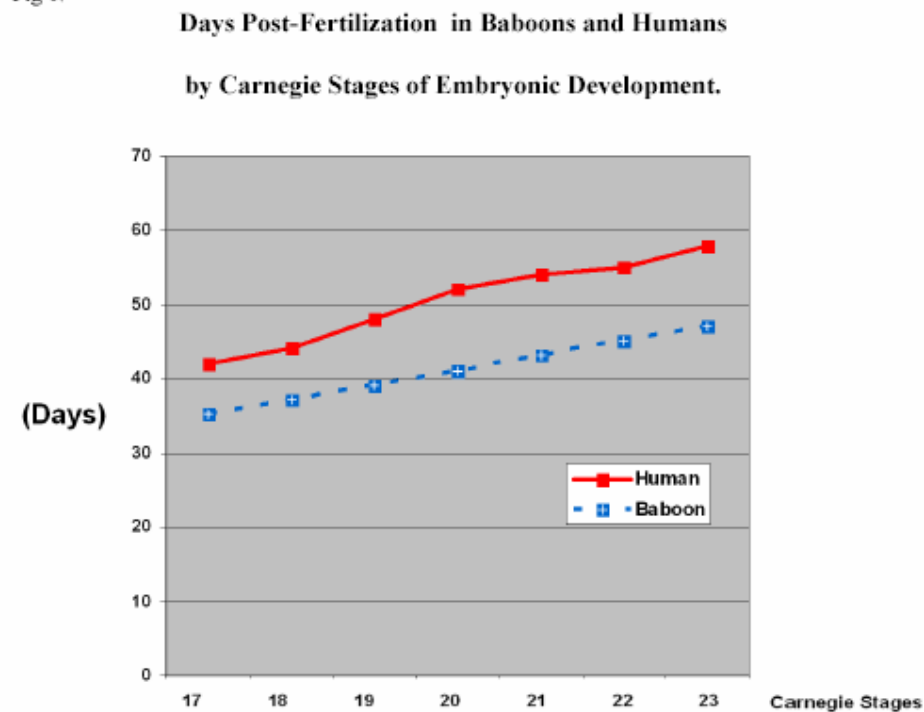


Fig 2

Ultrasonographic changes of embryonic CRL in Baboons and Humans
According to Carnegie Stages of Development

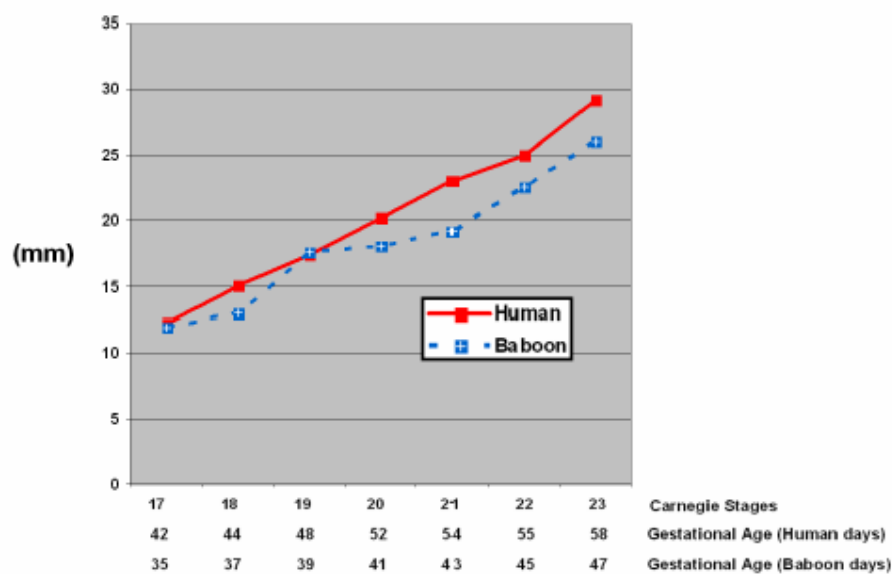


Fig 3

**Ultrasonographic changes of the Mean Diameter of the Gestational Sac in
Baboons and Humans according to
Carnegie Stages of Embryonic Development**

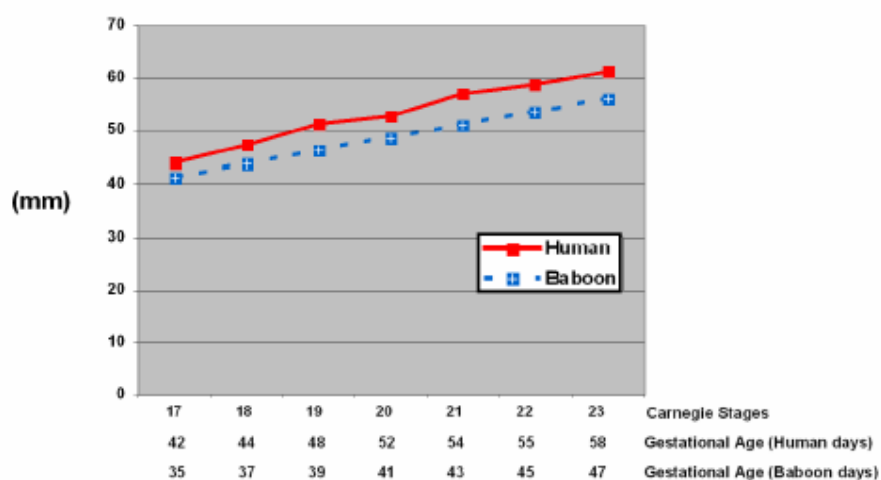


Fig 4

**Ultrasonographic changes of the Mean Diameter of the Amniotic Sac in
Baboons and Humans according to
Carnegie Stages of Embryonic Development**

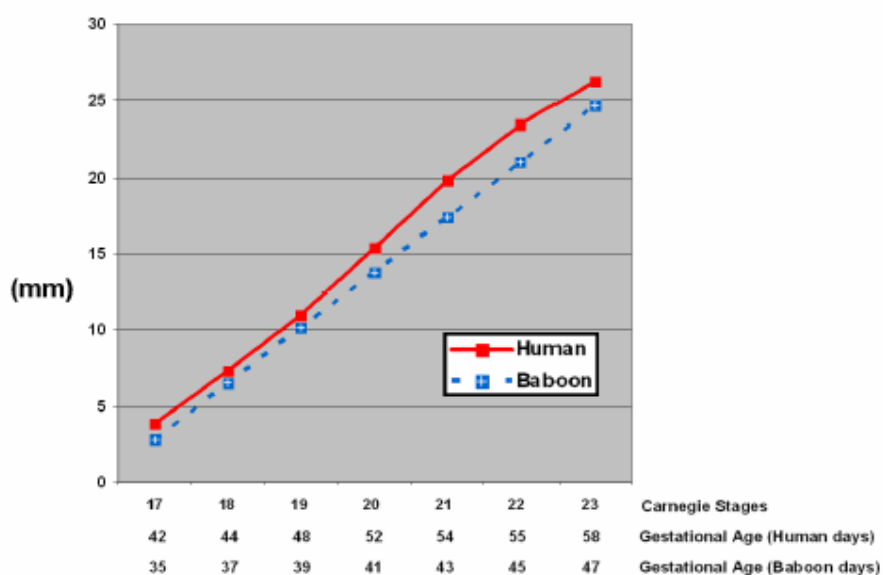


Fig 5

Ultrasonographic Changes of the Extra-embryonic Celomic Space
in Baboons and Humans according to
Carnegie Stages of Embryonic Development

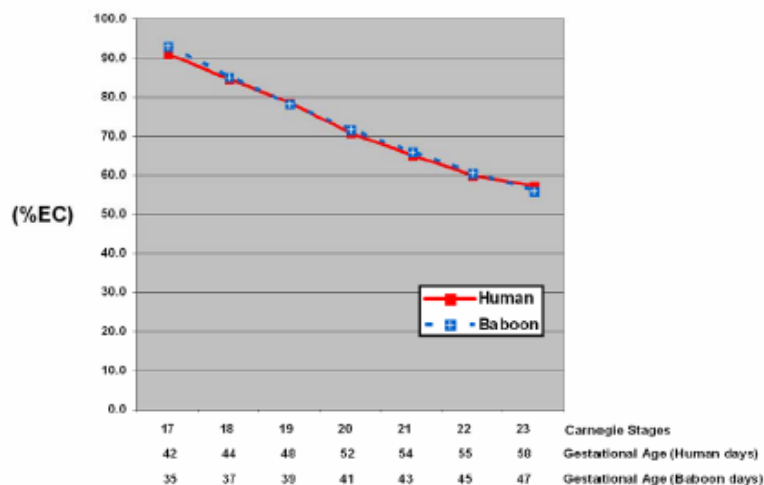


Fig 6

Ultrasonographic changes of the Mean Diameter of the Yolk Sac
in Baboons and Humans according to
Carnegie Stages of Embryonic Development

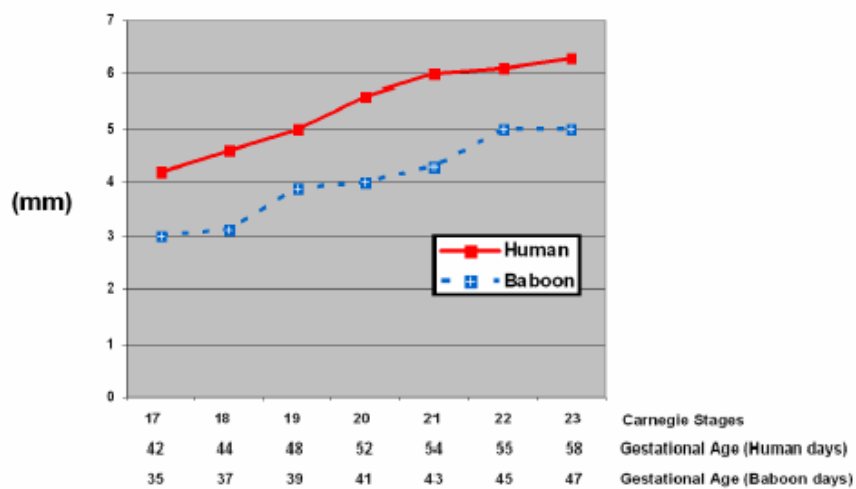
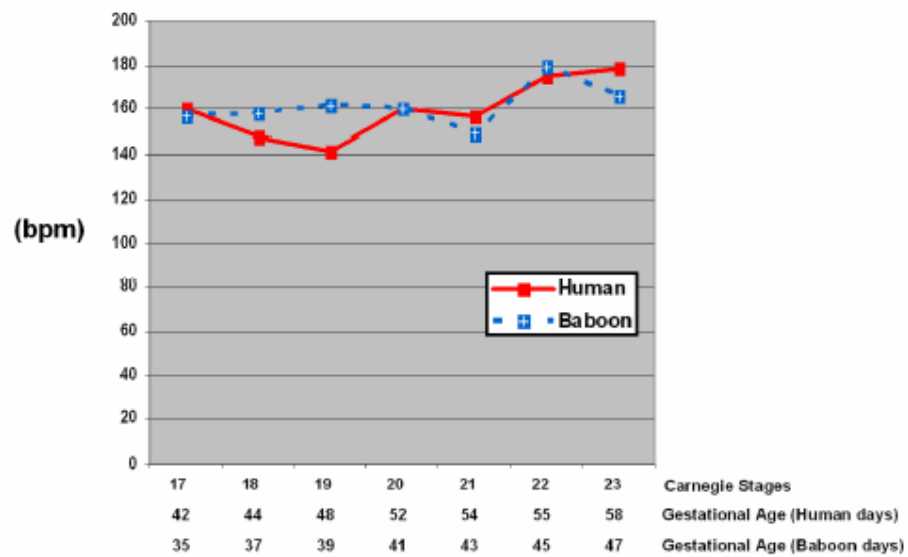


Fig 7

Ultrasonographic changes of the Embryonic Heart Rate
in Baboons and Humans according to
Carnegie Stages of Embryonic Development



References

1. SANTOLAYA-FORGAS J, VENGALIL S, MEYER W, FORTMAN J. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 1997;43:323-8.
2. SANTOLAYA-FORGAS J, DUVAL J, PRESPIN C, et al. Extracelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1124-7.
3. SANTOLAYA-FORGAS J, VENGALIL S, KUSHWAHA A, BIENIARZ A, FORTMAN J. Assessment of the risk of fetal loss after the coelocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:257-60.
4. HADLOCK FP, SHAH YP, KANON DJ, LINDSEY JV. Fetal crown-rump length: reevaluation of relation to menstrual age (5-18 weeks) with high-resolution real-time US. *Radiology* 1992;182:501-5.
5. SANTOLAYA-FORGAS J, DE LEON-LUIS J, D'ANCONA RL, MORGAN J, KAUFFMAN RP. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:262-9.
6. CARNEGIE.
<http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/embryo/wwwhuman/Stages/CStages.htm>
7. SANTOLAYA-FORGAS J, HEWITT T, MC CORQUODALE M, SHEN Z, DE CHRISTOPHER P. ABO/Rh(D) status, karyotype and FISH with human specific X and Y probes: Relatively simple ways for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells

- in the baboon model 2000 Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, 2000 (vol 4).
8. SANTOLAYA-FORGAS J, HEWITT T, SHEN Z, MC CORQUODALE M. Preliminary report on technical issues concerning the in-vitro growth of extracoelomic cells for chromosomal studies using the pregnant baboon model. 10th International Congress of Human Genetics. Vienna, Austria: European Journal of Human Genetics, 2001 (vol 1).
 9. SANTOLAYA-FORGAS J, DE LEÓN-LUIS JA, PINKSTON J, SIDDIQUI A. Specific and degenerative primers for Rh D/CE blood type could be a way for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells in baboon model 50th Annual Scientific Meeting. Society for Gynecologic Investigation. Washington.: Society for Gynecologic Investigation, 2003 (vol 10).
 10. SHIELDS LE, BRYANT EM, EASTERLING TR, ANDREWS RG. Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1157-60.
 11. TARANTAL AF, GOLDSTEIN O, BARLEY F, COWAN MJ. Transplantation of human peripheral blood stem cells into fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation* 2000;69:1818-23.
 12. HUANG S, ZENG F, GONG Z, et al. [A study of the engraftment, expansion and differentiation of human hematopoietic stem cells in goats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002;82:86-9.
 13. NOIA G, PIERELLI L, BONANNO G, et al. A novel route of transplantation of human cord blood stem cells in preimmune fetal sheep: the intracelomic cavity. *Stem Cells*

- 2003;21:638-46.
14. FUJIKI Y, FUKAWA K, KAMEYAMA K, et al. Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation. *Transplantation* 2003;75:916-22.
 15. LINCH DC, RODECK CH, NICOLAIDES K, JONES HM, BRENT L. Attempted bone-marrow transplantation in a 17-week fetus. *Lancet* 1986;2:1453.
 16. TOURAINE JL, RAUDRANT D, ROYO C, et al. In-utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome. *Lancet* 1989;1:1382.
 17. TOURAINE JL. In utero transplantation of fetal liver stem cells in humans. *Blood Cells* 1991;17:379-87.
 18. DIUKMAN R, GOLBUS MS. In utero stem cell therapy. *J Reprod Med* 1992;37:515-20.
 19. SLAVIN S, NAPARSTEK E, ZIEGLER M, LEWIN A. Clinical application of intrauterine bone marrow transplantation for treatment of genetic diseases--feasibility studies. *Bone Marrow Transplant* 1992;9 Suppl 1:189-90.
 20. THILAGANTHAN B, NICOLAIDES KH, MORGAN G. Intrauterine bone-marrow transplantation at 12 weeks' gestation. *Lancet* 1993;342:243.
 21. COWAN MJ, GOLBUS M. In utero hematopoietic stem cell transplants for inherited diseases. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994;16:35-42.
 22. WESTGREN M, RINGDEN O, EIK-NES S, et al. Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation* 1996;61:1176-9.
 23. FLAKE AW, RONCAROLO MG, PUCK JM, et al. Treatment of X-linked severe combined

- immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med* 1996;335:1806-10.
24. WENGLER GS, LANFRANCHI A, FRUSCA T, et al. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDX1). *Lancet* 1996;348:1484-7.
25. TOURAINE JL. In utero transplantation of fetal liver stem cells into human fetuses. *J Hematother* 1996;5:195-9.
26. FLAKE AW, ZANJANI ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. *Jama* 1997;278:932-7.
27. BAMBACH BJ, MOSER HW, BLAKEMORE K, et al. Engraftment following in utero bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:399-402.
28. HAYWARD A, AMBRUSO D, BATTAGLIA F, et al. Microchimerism and tolerance following intrauterine transplantation and transfusion for alpha-thalassemia-1. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:8-14.
29. MONNI G, IBBA RM, ZOPPI MA, FLORIS M. In utero stem cell transplantation. *Croat Med J* 1998;39:220-3.
30. LEUNG W, BLAKEMORE K, JONES RJ, et al. A human-murine chimera model for in utero human hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:1-7.
31. WESTGREN M, RINGDEN O, BARTMANN P, et al. Prenatal T-cell reconstitution after in utero transplantation with fetal liver cells in a patient with X-linked severe combined

CASOS CLÍNICOS

568 J.A. de León
J. Santolaya

**El saco vitelino y su
contribución al desarrollo
del saco amniótico antes de
las 6 semanas de gestación: a
propósito de un caso de
aborto retenido**

Departamento de Obstetricia y Ginecología. Texas Tech
University and Health Science Center. Amarillo. Texas. EE.UU.

*The yolk sac and its
contribution to the development
of the amniotic sac before the
sixth week of pregnancy: a case
of missed abortion*

Correspondencia:

Dr. J. Santolaya.
Department of Obstetrics and Gynecology. Division of
Reproductive Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound. Texas
Tech University Health Sciences Center.
1400 Coulter, Amarillo, TX 79106. EE.UU.
Correo electrónico: jsf@ama.ttuhs.c.edu

Fecha de recepción: 25/8/03
Aceptado para su publicación: 13/10/03

RESUMEN

La expansión del saco amniótico entre las semanas 5 y 14 de gestación se correlaciona con los cambios de la superficie embrionaria. En este trabajo describimos un embarazo de 6 semanas en el que las imágenes ecográficas demostraron los sacos amniótico y vitelino sin polo embrionario. Se especula sobre el mecanismo por el que puede acumularse líquido amniótico en ausencia de embrión.

PALABRAS CLAVE

Amniogénesis. Saco amniótico. Espacio extracelómico. Saco vitelino. Expansión del amnios. Primer trimestre del embarazo.

ABSTRACT

The expansion of the amniotic sac from the fifth to the fourteenth week of pregnancy correlates with changes in the embryonic surface. We describe a 6-week pregnancy in which ultrasonographic images demonstrated both the amniotic and yolk sacs without an embryonic pole. We speculate on the mechanism that allowed the accumulation of amniotic fluid in the absence of an embryo.

KEY WORDS

Amniogenesis. Amniotic sac. Extracelomic space. Yolk sac. Amnion expansion. First trimester of pregnancy.

De León JA, et al. El saco vitelino y su contribución al desarrollo del saco amniótico antes de las 6 semanas de gestación: a propósito de un caso de aborto retenido

INTRODUCCIÓN

La expansión del saco amniótico se correlaciona con la expansión de la superficie embrionaria no queratinizada entre la quinta y la decimocuarta semanas de gestación¹. Durante el segundo y tercer trimestres del embarazo, la expansión es multifactorial y depende del desarrollo de los sistemas urinario, digestivo y pulmonar, así como del paso de líquido a través del amnios, el cordón umbilical y la piel fetal².

Se presenta el caso de una paciente con un aborto retenido de 6 semanas, compuesto, según la exploración ecográfica, de saco gestacional (SG), saco vitelino (SV) y saco amniótico sin embrión. Este hallazgo indicaría que el SV pudo facilitar temporalmente la formación del saco amniótico.

CASO CLÍNICO

Una paciente de 32 años fue remitida a nuestro servicio de ecografía, debido a leve hemorragia vaginal en la sexta semana de gestación según la fecha de su última regla. Éste representaba su segundo embarazo y no existían antecedentes médicos, quirúrgicos, obstétricos o ginecológicos de interés. La exploración ecográfica transvaginal demostró un útero normal con un SG de 22 mm concordante con un embarazo de 6 semanas. Ambos anejos eran normales. Dentro del SG se pudo observar la cavidad amniótica, de 16 mm de diámetro medio, así como un SV hiperfringente de 3,3 mm de diámetro. No pudo identificarse el polo embrionario (fig. 1). Se informó a la paciente de estos resultados y de sus opciones terapéuticas, y eligió, al cabo de 2 días, la extracción de los productos ovulares mediante un legrado uterino bajo anestesia general. A las 6 h se le dio de alta sin complicaciones.

DISCUSIÓN

La implantación del blastocisto ocurre hacia el quinto día de embarazo. La formación del SG, espacio extracelómico, SV y saco amniótico, así como su composición, cambios con la edad gestacional y su relación con el embrión se estudiaron en los años cincuenta en muestras histológicas ob-



Figura 1. Ecografía vaginal que demuestra sacos gestacional, amniótico y vitelino hiperfringentes en una gestación intrauterina anembrionada.

tenidas tras histerectomías e hysterotomías³⁻⁶. En los primates, el saco amniótico deriva de la capa epiblastica en el embrión bilaminar. Células de la capa hipoblastica en el borde de este embrión bilaminar comienzan entonces a rodear la cavidad del blastocisto para formar el SV primario, del que derivará, por constricción, el SV secundario. Cuando se forma el mesoderma (embrión trilaminar), la notocorda surge como un agregado cilíndrico a partir del epiblasto en el llamado nódulo primitivo⁷. Las células notocordales se proyectan ventral-

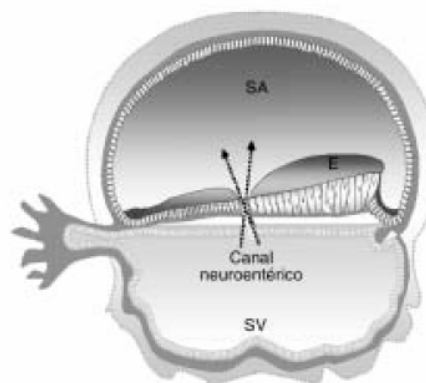


Figura 2. El desarrollo del canal neuroentérico durante la segunda semana del desarrollo embrionario permite la comunicación transitoria de los sacos vitelino (SV) y amniótico (SA). E: embrión.

De León JA, et al. El saco vitelino y su contribución al desarrollo del saco amniótico antes de las 6 semanas de gestación: a propósito de un caso de aborto retenido

570 mente y llegan a fusionar el epiblasto y el hipoblasto mediante el canal neuroentérico. Éste comunica por tanto, de forma transitoria, la cavidad amniótica y el SV secundario^{8,9}. Hoy, la introducción de la ecografía durante el primer trimestre de gestación ha facilitado el estudio *in vivo* del embarazo precoz normal y patológico tanto en humanos como en otros primates^{10,11}. El SV secundario puede visualizarse entre las semanas 5 y 12 de gestación como un anillo sumergido en el espacio extracelómico¹². La ausencia del SV en presencia de un SG mayor de 20 mm, la carencia de embrión

en SG mayores de 12-18 mm y la presencia de un SV con un diámetro mayor de 7 mm se han asociado con un mayor riesgo de complicaciones del embarazo.

El caso que presentamos induce a pensar que el líquido del espacio extracelómico pudo pasar al saco amniótico a través de un SV en ausencia de embrión funcional, probablemente debido a que el embrión llegó a desarrollarse hasta la fase de gastrulación creando el conducto neuroentérico (fig. 2)¹³.

Se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Santolaya-Forgas J, et al. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:262-9.
2. Brace RA, Roos MG, Robillard JE. Fetal and neonatal body fluids: the scientific basis for clinical practice. Reproductive and perinatal medicine (XI). New York: Perinatology Press, 1989; p. 118-28.
3. Lind T, Hytten FE. Relation of amniotic fluid volume to fetal weight in the first half of pregnancy. *Lancet* 1970;1:1147-9.
4. Robinson HP. «Gestation sac» volumes as determined by sonar in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82:100-7.
5. Levi CS, et al. Endovaginal US: demonstration of cardiac activity in embryos of less than 5.0 mm in crown-rump length. *Radiology* 1990;176:71-4.
6. Falco P, et al. Sonography of pregnancies with first-trimester bleeding and a small intrauterine gestational sac without a demonstrable embryo. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21:62-5.
7. Pereda TJ, Motta PM. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Med Electron Microsc* 1999;32:67-78.
8. Luckett WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152:59-97.
9. Luckett WP. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat* 1975;144:149-67.
10. Santolaya-Forgas J, et al. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 1997;43:323-8.
11. Santolaya-Forgas J, et al. Assessment of the risk of fetal loss after the coelocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:257-60.
12. Mantoni M, Pedersen JF. Ultrasound visualization of the human yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1979;7:459-60.
13. Santolaya-Forgas J, et al. Extracelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1124-7.

REVISIÓN

J.A. de León Luis^{a,c}
 L. Ortiz^a
 J.A. Clavero^a
 C. De León Luis^b
 J. Santolaya-Forgas^c

Actividad biológica de los compartimentos extraembrionarios

17

Biological activity of the extraembryonic compartments

^aDepartamento de Obstetricia y Ginecología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España. ^bFacultad de Medicina. Universidad de la Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España. ^cDivision of Reproductive's Genetics. Fetal Medicine and Ultrasound. Texas Tech University. Texas. Estados Unidos.

Este trabajo ha sido financiado por el Amarillo Women's Health Research Institute. Texas Tech University. El Dr. Juan Antonio de León Luis es actualmente becario del Fondo de Investigación Sanitaria (BEFI 02/9305).

Correspondencia:

Dr. J.A. de León Luis.
 Texas Tech University Health Sciences Center.
 Division of Reproductive's Genetics, Fetal Medicine and Ultrasound.
 Department of Obstetrics and Gynecology.
 1400 Coulter. Amarillo, TX 79106. Estados Unidos.
 Correo electrónico: jleon@ama.ttuhsu.edu

Fecha de recepción: 28/11/03
 Aceptado para su publicación: 1/4/04

J.A. de León Luis, L. Ortiz, J.A. Clavero, C. De León Luis, J. Santolaya-Forgas. Actividad biológica de los compartimentos extraembrionarios.

RESUMEN

Los avances en los equipos ecográficos y la realización de técnicas invasivas durante el primer trimestre del embarazo han permitido un acercamiento sin precedentes al entendimiento del desarrollo embrionario. Durante el primer trimestre del embarazo, el análisis de las muestras procedentes de suero materno, celoma extraembrionario, saco vitelino y saco amniótico, obtenidas tanto en humanos como en modelos animales, han puesto de manifiesto los cambios sucesivos que se producen en las características fisicoquímicas de estos líquidos en respuesta al desarrollo del propio embrión y sus anejos.

PALABRAS CLAVE

ABSTRACT

Advances in ultrasonographic equipment and the use of invasive techniques in the first trimester of pregnancy have allowed unprecedented knowledge of embryo development. In the first trimester of pregnancy, analysis of samples from maternal serum, extraembryonic celom, vitelline sac and amniotic sac both from humans and from animal models have revealed the successive changes in the physiochemical characteristics of these fluids in response to the development of the fetus and the extraembryonic compartments.

KEY WORDS

178 INTRODUCCIÓN

En los años cincuenta, tanto el embrión como las estructuras extraembrionarias humanas sólo podían estudiarse en muestras obtenidas tras histerotomías o histerectomías realizadas en mujeres gestantes^{1,2}. Estos estudios demostraron que la implantación se producía 2 semanas después de la fecundación del ovocito y que, en ese momento, el blastocisto estaba compuesto morfológicamente por 2 grupos celulares: las células del embrioblasto y la capa de células citotrofoblásticas, que rodean la cavidad blastocelómica^{2,3}.

La embriología comparada supuso, sin duda, un gran avance en el conocimiento de cada una de las estructuras presentes en el comienzo del embarazo. Sin embargo, este avance estaba limitado por la dificultad de acceso *in vivo* al entorno embrionario. Hoy día, la ecografía permite no sólo la identificación de embarazos desde la semana 3 posfecundación sino también el reconocimiento de las estructuras presentes en el saco gestacional durante el primer trimestre del embarazo (embrión, sacos amniótico y vitelino, y el celoma extraembrionario)^{4,7}. Además de la descripción física de estos componentes *in vivo*, técnicas ecoguiadas han permitido el estudio de muestras provenientes de cada uno de los compartimentos extraembrionarios^{2,3}.

En este estudio se presentan una revisión del desarrollo de las estructuras extraembrionarias humanas y un resumen de los gradientes de solutos existentes entre el suero materno y los compartimentos extraembrionarios.

DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBRIONARIAS

En el momento de la implantación el blastocisto está formado por 2 tipos celulares que forman el embrioblasto y las células citotrofoblásticas que rodean el saco gestacional^{3,8}. Aunque se desconoce cómo se diferencia el embrioblasto humano, la biología comparada ha demostrado que éste se esfacea en 2 capas celulares: *a)* el epiblasto, formado por células de la porción dorsal con características epiteliales y con membrana basal, y *b)* el hipoblasto, formado por células cuboideas adyacentes a la cavidad blastocelómica^{2,9}.

Al proliferar el epiblasto se van creando lagunas líquidas intercelulares que, tras ir confluyendo, desplazan un grupo de células hacia el exterior; este grupo de células se diferenciará en amniocitos^{10,11}. Hacia el día 9 posfecundación, células del hipoblasto embrionario comienzan a migrar y a tapizar la superficie de la vesícula blastocelómica formando el endodermo extraembrionario. La vesícula rodeada de este endodermo constituye, desde ahora, el saco vitelino primario^{1,2}. Hacia los 11 días posfertilización se puede identificar el mesodermo extraembrionario. Las células mesodérmicas se originan a partir de las porciones más distales del embrión y se sitúan entre el endodermo extraembrionario y el citotrofoblasto, y rodean todas las estructuras de origen embrioblástico². Algunos autores han sugerido que la cavidad extracelómica se forma como consecuencia de la rotura del mesodermo extraembrionario, por su incapacidad para seguir la rápida expansión del citotrofoblasto dentro de la decidua materna (origen trofoblástico)¹². Otros autores sugieren que la coalescencia de múltiples lagunas intercelulares es lo que crea la cavidad extracelómica dentro del mesodermo extraembrionario (origen mesodérmico)^{2,3,13}.

Durante la semana 3 del desarrollo, el saco vitelino secundario (SV) queda configurado como una vesícula que protruye de la porción ventral del embrión, con una pared compuesta por mesodermo y endodermo extraembrionario¹⁴. Después de los sucesivos plegamientos tridimensionales del embrión se comienzan a crear las estructuras intraembrionarias. Estos plegamientos, además, producen la constricción de la base del SV y dan lugar al conducto vitelino. La progresiva elongación del conducto vitelino hace que eventualmente el SV aparezca como un globo inmerso en la cavidad extracelómica unido por el conducto vitelino a la pared abdominal del embrión. Dentro de la porción mesodérmica de la pared del SV se crean "islotas" celulares hemangio-citoblásticas^{15,16}. Las células centrales de estos islotas se diferencian en células hematopoyéticas mientras que las más periféricas dan lugar a las células endoteliales de los vasos sanguíneos extraembrionarios que conectarán, más adelante, con el sistema circulatorio del propio embrión^{17,18}.

Caudal al SV se unen el mesodermo embrionario y el extraembrionario, y crean un tallo; dentro de este tallo mesodérmico se sitúa la segunda vesícula de origen hipoblástico, llamada alantoides. Tanto el

conducto vitelino como el alantoides se convertirán en estructuras vestigiales más allá del primer trimestre. De este tallo de conexión también surgirá el cordón umbilical (fig. 1)^{19,20}.

Las células citotrofoblásticas, después de una serie de cambios estructurales, forman el tejido corial, que establece la comunicación entre el saco gestacional y la decidua materna^{8,21}. Inicialmente, se forman las vellosidades coriales primarias, compuestas por columnas citotrofoblásticas rodeadas de una fina capa de sincitiotrofoblasto. Posteriormente, el mesodermo extraembrionario se introducirá entre las células citotrofoblásticas y dará lugar a las vellosidades secundarias. Dentro de este soporte mesenquimal se formarán los vasos sanguíneos placentarios, que darán funcionalidad a las vellosidades llamadas terciarias^{22,23}. Desde la semana 6 de gestación, pueden observarse vellosidades de tipo primario, secundario y terciario, y conforme avance el embarazo, el porcentaje de vellosidades terciarias será el más importante.

A medida que el saco amniótico crece y contacta con las vellosidades coriales, éstas degeneran, formando el corion leve. Las vellosidades asociadas a la decidua basal, no en contacto con el saco amniótico, proliferan y forman el corion frondoso o placenta definitiva (fig. 1)¹.

ECOGRAFÍA Y DESARROLLO DE LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBRIONARIAS

El saco gestacional puede detectarse entre los días 15 y 21 posfecundación como una imagen ecográfica, esférica, de 2-3 mm de diámetro, situada dentro de la pared endometrial (fig. 2a)^{24,25}. El saco vitelino es la primera estructura inequívocamente embrionaria que puede visualizarse por ecografía a partir de los 21 días posfecundación, inmerso en el espacio extracelómico (fig. 2b)^{26,27}. La imagen característica es de un «anillo» de 3 a 6 mm. El SV desaparece ecográficamente entre las 9-10 semana posfecundación²⁸⁻³⁰. Varios estudios prospectivos han analizado el valor clínico de las mediciones de los sacos gestacional y vitelino, con resultados a veces contradictorios³¹⁻³³. Sin embargo, parece que existe consenso en señalar que la ausencia de SV en presencia de un saco gestacional mayor de 20 mm, o la presencia de un SV con un diámetro mayor de 7

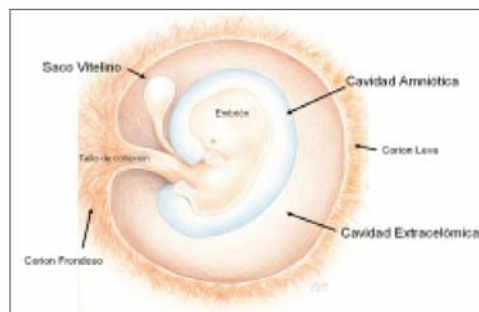


Figura 1. Representación gráfica de un embrión y de las estructuras extraembrionarias humanas en torno a la quinta y sexta semanas de gestación.

mm, asocian un riesgo elevado de pérdida del embarazo (fig. 2c)³¹. Aunque la ecografía tridimensional y el Doppler color han descrito el volumen y la vascularización del SV, su utilidad clínica no está clara, ya que existe la posibilidad de que estas técnicas hayan podido aumentar de forma iatrogénica la tem-



Figuras 2a y b. Imágenes ecográficas de embarazo normales a las 2 y las 4 semanas posfecundación.

180



Figura 2c. Saco vitelino anormal dentro del saco gestacional durante la semana quinta posfecundación, en un embarazo que terminó en aborto espontáneo.

peratura local y afectar, de esta forma, el desarrollo normal del embarazo^{20,31,34}.

La cavidad extracelómica se visualiza ecográficamente como el espacio entre la superficie corial del saco gestacional y la cavidad amniótica en desarro-

llo³⁵. A las 5 semanas posfecundación ocupa más de la mitad del saco gestacional. Posteriormente, y debido a la rápida expansión de la cavidad amniótica, el porcentaje del saco gestacional ocupado por la cavidad extracelómica va disminuyendo hasta desaparecer hacia la semana 12 posfecundación (fig. 3).

El saco amniótico se puede visualizar por ecografía a partir de la semana 4 posfecundación. Aparece como una membrana que se expande alrededor del embrión y termina por obliterar la cavidad extracelómica al final del primer trimestre (fig. 3)^{4,5,36,37}. Para acumular líquido, el saco amniótico tiene que ser prácticamente impermeable. La expansión del saco amniótico entre las semanas 5 y 14 de gestación se correlaciona con la expansión de la superficie embrionaria⁵. Más allá de la semana 12 de gestación, la circulación fetoplacentaria, el sistema urogenital, el aparato digestivo y los pulmones fetales son los mayores determinantes de la producción de líquido amniótico^{5,38}.

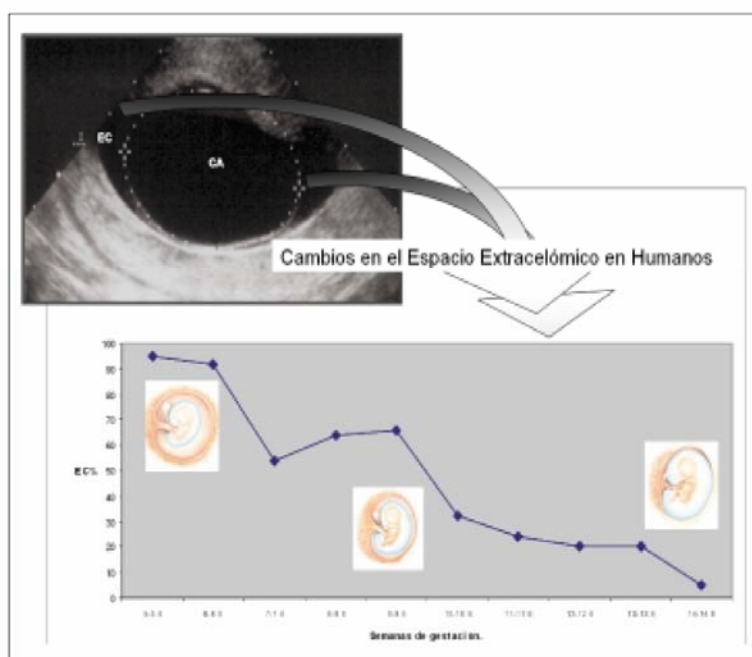


Figura 3. Visualización ecográfica de la cavidad amniótica (CA) y el espacio extracelómico (EC). La gráfica demuestra el porcentaje del saco gestacional ocupado por el EC entre las semanas 5 y 14 de gestación.

HISTORIA DE LA CELOCENTESIS

Durante los años setenta la amniocentesis permitió el estudio del líquido amniótico y, con ello, el estudio del ambiente fetal. Estos estudios, realizados durante el segundo y el tercer trimestre de gestación, demostraron los cambios en las características fisicoquímicas del líquido amniótico y sus relaciones con los cambios que acontecían en el suero materno^{39,40}. En esos años, la cavidad extracelómica se veía como un espacio virtual muchas veces ignorado por los ecografistas. Por tanto, muchas de las muestras obtenidas tras amniocentesis hechas antes de la semana 14 desde la última regla proporcionaban resultados contradictorios en cuanto a la composición del líquido amniótico^{12,41}. La aparición de las sondas ecográficas transvaginales han facilitado el reconocimiento de las estructuras existentes dentro del saco gestacional y, más concretamente, han permitido visualizar de forma clara la membrana amniótica^{4,5,42}. Este avance ha permitido el abordaje correcto de cada uno de los compartimientos extraembrionarios, y el estudio de la distribución de diversos solutos a un lado u otro de éstos.

Los cambios ecográficos del espacio extracelómico se han descrito tanto en embarazos humanos como en el modelo *Papio anubis* (babuino) (figs. 2 y 3)^{5,6,11}. En primates no humanos, el momento más seguro para realizar la celocentesis se sitúa en torno a los 40 días postfecundación. Recientemente se ha sugerido que la celocentesis ecoguiada no sólo es reproducible sino que tiene una curva de aprendizaje relativamente corta. La celocentesis puede realizarse tanto por la vía transvaginal como la transabdominal, y tiene un riesgo de pérdida de embarazo estimado en un 3%^{11,43}. Al igual que la amniocentesis precoz y la biopsia de corion, la celocentesis ha permitido establecer el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas⁴³⁻⁴⁷.

EJEMPLOS DE LA PRESENCIA DE UNA DINÁMICA DE SOLUTOS ENTRE LA MADRE Y LOS DISTINTOS COMPARTIMIENTOS DEL SACO GESTACIONAL

El embrión está dentro del saco amniótico, y los sacos amniótico y vitelino están inmersos en el espacio extracelómico, y separados físicamente de la

superficie uterina (fig. 1). Para que progrese la gestación se han de desarrollar un flujo de solutos de la madre al embrión y del embrión a la madre. El espacio intersticial de la decidua materna, el tejido corial, la cavidad extracelómica, el SV y el saco amniótico compartimentalizan los solutos y solventes necesarios para el desarrollo del embarazo.

En primates y humanos, la membrana coriódécidual es biológicamente semipermeable⁴⁸. Esto lo demuestra el hecho de que moléculas de bajo peso molecular, como la urea, la glucosa o los electrolitos, responsables de la osmolalidad, están distribuidas de forma similar en el suero materno y el líquido extracelómico. La distribución de proteínas en ambos fluidos es, por el contrario, significativamente distinta y con un gradiente global aproximado de 18:1 (suero materno, 18; líquido celómico, 1). Sin embargo, las proteínas tienen gradientes particulares dependiendo de su origen y, probablemente también, de las variaciones funcionales que van ocurriendo durante el embarazo^{49,50}. Así, por ejemplo, las proteínas totales y la prealbúmina aumentan en el líquido extracelómico durante el primer trimestre del embarazo, a pesar de que sus valores en el suero materno disminuyen debido a la hemodilución fisiológica que ocurre durante este período del embarazo. Estos hallazgos sugieren que los cambios proteínicos en el líquido extracelómico son independientes de los que ocurren en el suero materno^{37,51}. Más evidencia de cambios proteínicos selectivos se ha adquirido tras el análisis de una gran variedad de proteínas específicas de origen trofoblástico, como el lactógeno placentario, la activina A y la inhibina, que están más elevadas en el líquido extracelómico que en el suero materno. La gonadotropina coriónica humana (hCG) no sólo aumenta en el espacio celómico durante el primer trimestre del embarazo sino que alcanza valores que son 185 veces más elevados que en el suero materno. La vitamina B₁₂, la prolactina y la proteína placentaria 14, de origen decidua, se encuentran también más elevadas en el líquido celómico que en el suero materno. Los valores de estradiol y de progesterona, por el contrario, disminuyen en el líquido celómico durante el primer trimestre del embarazo^{52,53}.

El estudio del crecimiento embrionario ha llevado también al análisis del suministro de aminoácidos y factores de crecimiento, como los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y sus *binding*

181

De León Luis JA. Actividad biológica de los compartimentos extraembrionarios

182

Tabla 1 Capas histológicas y cambios fisiológicos que tienen lugar en la pared del saco vitelino durante el primer trimestre de gestación

Endodermo	Hasta la quinta semana posfecundación es una monocapa de células cuboideas (10-20 μ m de diámetro). Cordones celulares de esta capa atraviesan la capa mesenquimal y alcanzan el mesotelio, formando un entramado tubular que facilita el transporte de fluido y sustancias a través de la pared. Esta estructura tubular es similar a la que se forma en el endodermo digestivo y pulmonar. Las células de esta capa endodérmica también tienen la capacidad de producir proteínas (prealbúmina, albúmina, α -fetoproteína, α 1 antitripsina y transferrina). A partir de la quinta semana posfecundación, las células endodérmicas disminuyen de tamaño y comienzan a mostrar cambios degenerativos, y su pared se torna irregular y pierde grosor
Mesodermo	Hasta la quinta semana posfecundación esta capa es la de mayor grosor. Está formada por hemangiocitoblastos, células de características fibroblásticas y macrófagos. Los hemangiocitoblastos tienden a agruparse en islotes donde las células periféricas darán lugar a los vasos sanguíneos (vasculogenia). Las células centrales darán lugar las células madres hematopoyéticas (hematopoyesis primitiva). Los vasos sanguíneos están fenestrados y sin membrana basal. La hematopoyesis es fundamentalmente eritroide. También en esta capa aparecen las células progenitoras gonadales. Más allá de la quinta semana posfecundación esta capa comienza a involucionar y los vasos sanguíneos se hacen más tortuosos e irregulares
Mesotelio	Células de características epiteliales con una membrana basal discontinua. Inicialmente, las células de esta capa presentan abundantes complejos de Golgi y borde en cepillo. Durante el proceso de involución de toda la pared del saco vitelino dichas organelas van disminuyendo en número dentro del citoplasma

proteins (p. ej., IGFBP-1). Hoy día, sabemos que existe transporte activo de aminoácidos de la madre al embrión y que éstos se acumulan en el líquido extracelómico^{54,55}. También se ha demostrado que los IGF se encuentran en concentraciones más elevadas en el líquido celómico que en el suero materno⁵⁶⁻⁵⁹. Además, se sabe que en suero materno hay valores más elevados de la forma fosforilada de IGFBP-1, mientras que en el líquido celómico los valores de la IGFBP-1 no fosforilada son los más elevados. Esto indica una inhibición de la función biológica de IGF-II en la madre y disponibilidad de IGF-II en el líquido celómico⁵⁶.

La capa endodérmica del SV es también capaz de sintetizar proteínas similares a las que producirá el hígado fetal. Estas proteínas, que incluyen una isoforma de la α -fetoproteína (AFP), la α 1-antitripsina, la albúmina, la prealbúmina y la transferrina, son secretadas mayoritariamente al entorno embrionario, por lo que contribuyen muy poco al conjunto de las proteínas plasmáticas maternas^{60,61}. Por el contrario, la AFP embrionaria, que puede ser diferenciada de la producida por el SV, debido a su elevado peso molecular (\pm 70 kDa), se distribuye entre los líquidos amnióticos, extracelómicos y suero materno⁶². La pared del SV también tiene un potencial absoritivo, ya que algunas enzimas y proteínas no producidas por el SV se encuentran en concentraciones si-

milares en los líquidos de los saco vitelino y el espacio celómico antes de la semana 10 de gestación^{1,33}. En la tabla 1 exponen las características histológicas de la pared del SV, así como los cambios que ocurren en ella según la edad gestacional.

Finalmente, moléculas tan variadas como las hormonas tiroideas maternas, el hierro, factores del complemento, la relaxina y algunas inmunoglobulinas específicas IgG, IgM e IgA contra *Toxoplasma gondii*, citomegalovirus o rubéola, también se han medido en el líquido celómico antes de las 12 semanas de gestación, lo que demuestra que pasan desde el suero materno, ya que ni el embrión ni el SV son capaces de sintetizar estos compuestos en este estadio del embarazo^{63,64}. La acumulación de hierro en el espacio extracelómico probablemente soporta la elevada eritropoyesis que tiene lugar durante este período embrionario^{65,66}. La presencia de inmunoglobulinas específicas en el espacio celómico demuestra la existencia temprana de inmunidad adquirida^{60,67,68}.

CONCLUSIÓN

La ecografía ha permitido demostrar que los compartimentos extraembrionarios y, en particular, el espacio extracelómico, son biológicamente selectivos y dinámicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pereda TJ, Motta PM. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Med Electron Microsc* 1999;32:67-78.
2. Luckett WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152:59-97.
3. Luckett WP. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat* 1975;144:149-67.
4. Jeanty P, Renoy P, Van Kerkem J, Dagnelie J, Struyven J. Ultrasonic demonstration of the amnion. *J Ultrasound Med* 1982;1:243-7.
5. Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J, D'Ancona RL, Morgan J, Kauffman RP. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 2003;18:262-9.
6. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Meyer W, Fortman J. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 1997;43:323-8.
7. Weissman A, Itskovitz-Eldor J, Jakobi P. Sonographic measurement of amniotic fluid volume in the first trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med* 1996;15:771-4.
8. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester—a review. *Placenta* 2001;22(Suppl A):S70-7.
9. Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet* 1993;46:542-50.
10. Jones CJ, Jauniaux E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. *Micron* 1995;26:145-73.
11. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Kushwaha A, Bieniarz A, Fortman J. Assessment of the risk of fetal loss after the coelocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 1998;13:257-60.
12. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Campbell S, Collins WP, Ooms HA. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod* 1994;9:161-6.
13. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth-promoting effects of different fractions of extra-embryonic coelomic fluid on embryonic development. *Anat Histol Embryol* 2000;29:225-34.
14. Hesseldahl H, Larsen JF. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat* 1969;126:315-35.
15. Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* 1999;94:2179-91.
16. Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. *Blood* 1995;86:4474-85.
17. Gonzalez-Crussi F, Roth LM. The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. *Hum Pathol* 1976;7:675-91.
18. Takashina T. Haemopoiesis in the human yolk sac. *J Anat* 1987;151:125-35.
19. Kurjak A, Kupesic S, Kostovic L. Vascularization of yolk sac and vitelline duct in normal pregnancies studied by transvaginal color and pulsed Doppler. *J Perinat Med* 1994;22:433-40.
20. Kurjak A, Kupesic S, Kos M. Three-dimensional sonography for assessment of morphology and vascularization of the fetus and placenta. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:186-202.
21. Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:718-24.
22. Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000;6:485-94.
23. Jauniaux E, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J. Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 1991;12:269-76.
24. Goldstein I, Zimmer EA, Tamir A, Peretz BA, Paldi E. Evaluation of normal gestational sac growth: appearance of embryonic heartbeat and embryo body movements using the transvaginal technique. *Obstet Gynecol* 1991;77:885-8.
25. Jurkovic D, Gruboeck K, Campbell S. Ultrasound features of normal early pregnancy development. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995;7:493-504.
26. Mantoni M, Pedersen JF. Ultrasound visualization of the human yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1979;7:459-60.
27. Sauerbrei E, Cooperberg PL, Poland BJ. Ultrasound demonstration of the normal fetal yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1980;8:217-20.
28. Mara E, Foster GS. Spontaneous regression of a yolk sac associated with embryonic death. *J Ultrasound Med* 2000;19:655-6.
29. Makikallio K, Tekay A, Jouppila P. Yolk sac and umbilicoplacental hemodynamics during early human embryonic development. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;14:175-9.
30. Stampone C, Nicotra M, Muttinelli C, Cosmi EV. Transvaginal sonography of the yolk sac in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound* 1996;24:3-9.

- 184 31. Figueras F, Torrents M, Munoz A, Comas C, Antolin E, Echevarria M, et al. Three-dimensional yolk and gestational sac volume. A prospective study of prognostic value. *J Reprod Med* 2003;48:252-6.
32. Levi CS, Lyons EA, Lindsay DJ. Early diagnosis of nonviable pregnancy with endovaginal US. *Radiology* 1988;167:383-5.
33. Jauniaux E, Jurkovic D, Henriot Y, Rodesch F, Hustin J. Development of the secondary human yolk sac: correlation of sonographic and anatomical features. *Hum Reprod* 1991;6:1160-6.
34. Kupesic S, Kurjak A. Volume and vascularity of the yolk sac assessed by three-dimensional and power Doppler ultrasound. *Early Pregnancy* 2001;5:40-1.
35. Campbell J, Wathen N, Perry G, Soneji S, Sourial N, Chard T. The coelomic cavity: an important site of materno-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:765-7.
36. Robinson HP. "Gestation sac" volumes as determined by sonar in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82:100-7.
37. Blackburn S, Loper D. Maternal, fetal, and neonatal physiology: a clinical perspective. 2nd ed. Philadelphia: Harcourt, 1992.
38. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Gervy C, Ooms HA. Biochemical investigation of fetal renal maturation in early pregnancy. *Pediatr Res* 1996;39:731-5.
39. Nagamani M, McDonough PG, Ellegood JO, Mahesh VB. Maternal and amniotic fluid steroids throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:674-80.
40. Evans ML, Drugan A, Koppitch FC 3rd, Zador IE, Sacks AJ, Sokol RJ. Genetic diagnosis in the first trimester: the norm for the 1990s. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1332-6; discussion 1336-9.
41. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98:866-70.
42. Soothill PW, Nicolaides KH, Rodeck CH, Campbell S. Amniotic fluid and fetal tissues are not heated by obstetric ultrasound scanning. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:675-7.
43. Makrydimas G, Kaponis A, Skentou C, Lolis D. Short-term safety of celocentesis for the mother and the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19:243-5.
44. Jauniaux E, Cirigliano V, Adinolfi M. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Reprod Biomed Online* 2003;6:494-8.
45. Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. Turner's syndrome 45,X found by celocentesis. *Prenat Diagn* 1997;17:588-9.
46. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Mitchell M, Lees C, Layton M. Detection of sickle gene by celocentesis in early pregnancy: a new approach to prenatal diagnosis of single gene disorders. *Hum Reprod* 1995;10:1287-9.
47. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by celocentesis. *Mol Hum Reprod* 1997;3:729-31.
48. Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, Vengalil S, Kushwaha A, Wilson L, et al. Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1124-7.
49. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2954-9.
50. Campbell J, Wathen N, Macintosh M, Cass P, Chard T, Mainwaring Burton R. Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:563-5.
51. Jauniaux E, Gulbis B. Fluid compartments of the embryonic environment. *Hum Reprod Update* 2000;6:268-78.
52. Atkinson G, Campbell DJ, Cawood ML, Oakey RE. Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44:435-40.
53. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Schaaps JP, Campbell S, Meuris S. Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1993;8:782-7.
54. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK, Van Raaij-Selten B, Chard T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:20-4.
55. Jauniaux E, Sherwood RA, Jurkovic D, Boa FG, Campbell S. Amino acid concentrations in human embryological fluids. *Hum Reprod* 1994;9:1175-9.
56. Martina NA, Kim E, Chitkara U, Wathen NC, Chard T, Giudice LC. Gestational age-dependent expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoforms in human extraembryonic cavities, maternal serum, and decidua suggests decidua as the primary source of IGFBP-1 in these fluids during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1894-8.
57. Nonoshita LD, Wathen NC, Dsupin BA, Chard T, Giudice LC. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy: their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1249-55.
58. Miell JP, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Mol Hum Reprod* 1997;3:343-9.
59. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. *J Anat* 2001;198:651-62.
60. Gitlin D, Perricelli A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-fetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. *Nature* 1970;228:995-7.

61. Shi WK, Hopkins B, Thompson S, Heath JK, Luke BM, Graham CF. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sack and other foetal organs. *J Embryol Exp Morphol* 1985;85:191-206.
62. Gulbis B, Jauniaux E, Cotton F, Stordeur P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. *Mol Hum Reprod* 1998;4:857-62.
63. Contempre B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S, De Escobar GM. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1719-22.
64. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asuncion M, Gervy C, Contempre B, et al. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1768-77.
65. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997;273:R1829-44.
66. Campbell J, Wathen N, Lewis M, Fingerova H, Chard T. Erythropoietin levels in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:974-6.
67. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10:3297-300.
68. Gitlin D, Biasucci A. Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta 1C-beta 1A, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *J Clin Invest* 1969;48:1433-46.

185

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Zanjani ED, Anderson WF. Prospects for in utero human gene therapy. *Science* 1999;285(5436):2084-8.
2. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998;392(6679 Suppl):25-30.
3. Flake AW, Zanjani ED. In utero transplantation of hematopoietic stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993;15(1):35-48.
4. Douar AM, Themis M, Coutelle C. Fetal somatic gene therapy. *Mol Hum Reprod* 1996;2(9):633-41.
5. Porada CD, Park P, Almeida-Porada G, Zanjani ED. The sheep model of in utero gene therapy. *Fetal Diagn Ther* 2004;19(1):23-30.
6. Westgren M, Ringden O, Bartmann P, Bui TH, Lindton B, Mattsson J, et al. Prenatal T-cell reconstitution after in utero transplantation with fetal liver cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187(2):475-82.
7. Jones DR, Bui TH. Fetal therapy: prospects for transplantation early in pregnancy. In utero stem cell transplantation and gene therapy: second international meeting, Nottingham, UK, 1-2 September 1997. *Mol Med Today* 1998;4(1):10-1.
8. Davies JC, Geddes DM, Alton EW. Gene therapy for cystic fibrosis. *J Gene Med* 2001;3(5):409-17.
9. McCray PB, Jr. Cystic fibrosis. Difficulties of gene therapy. *Lancet* 2001;358 Suppl:S19.
10. Tran ND, Porada CD, Zhao Y, Almeida-Porada G, Anderson WF, Zanjani ED. In utero transfer and expression of exogenous genes in sheep. *Exp Hematol* 2000;28(1):17-30.
11. Karson EM, Polvino W, Anderson WF. Prospects for human gene therapy. *J Reprod Med* 1992;37(6):508-14.
12. VandenDriessche T, Collen D, Chuah MK. Gene therapy for the hemophilias. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1550-8.
13. Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. *Jama* 1997;278(11):932-7.
14. Flake AW, Zanjani ED. Cellular therapy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24(1):159-77.
15. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ascensao JL, MacKintosh FR, Flake AW. Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells* 1997;15 Suppl 1:79-92; discussion 93.

16. Pereda TJ, Motta PM. New advances in human embryology: morphofunctional relationship between the embryo and the yolk sac. *Med Electron Microsc* 1999;32(2):67-78.
17. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
18. Kawashima I, Zanjani ED, Almaida-Porada G, Flake AW, Zeng H, Ogawa M. CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* 1996;87(10):4136-42.
19. Goodell MA. Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? *Blood* 1999;94(8):2545-7.
20. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3(12):1337-45.
21. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(25):14482-6.
22. Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8(2):113-24.
23. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 1992;12(4):788-94.
24. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hemopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia* 1989;3(11):773-6.
25. He XY, Antao VP, Basila D, Marx JC, Davis BR. Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood* 1992;79(9):2296-302.
26. Sutherland DR, Watt SM, Dowden G, Karhi K, Baker MA, Greaves MF, et al. Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia* 1988;2(12):793-803.
27. Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):1029-34.
28. Pomyje J, Zivny J, Sefc L, Plasilova M, Pytlik R, Necas E. Expression of genes regulating angiogenesis in human circulating hematopoietic cord blood CD34+/CD133+ cells. *Eur J Haematol* 2003;70(3):143-50.

29. Young AJ, Holzgreve W, Dudler L, Schoeberlein A, Surbek DV. Engraftment of human cord blood-derived stem cells in preimmune ovine fetuses after ultrasound-guided in utero transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189(3):698-701.
30. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000;342(25):1846-54.
31. Slavin S. Maternal-fetal relationship, natural chimerism and bilateral transplantation tolerance as the basis for non-myeloablative stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 1:172-5.
32. Flake AW, Hendrick MH, Rice HE, Tavassoli M, Zanjani ED. Enhancement of human hematopoiesis by mast cell growth factor in human-sheep chimeras created by the in utero transplantation of human fetal hematopoietic cells. *Exp Hematol* 1995;23(3):252-7.
33. Barker JN, Wagner JE. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3(7):526-32.
34. Tavian M, Hallais MF, Peault B. Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 1999;126(4):793-803.
35. Ploemacher RE. Characterisation and biology of normal human haematopoietic stem cells. *Haematologica* 1999;84 Suppl EHA-4:4-7.
36. Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO. [Effect of protection of the spleen during total body irradiation on the blood in rabbit.]. *Rev Hematol* 1953;8(4):515-32.
37. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.
38. Bender JG, Williams SF, Myers S, Nottelman D, Lee WJ, Unverzagt KL, et al. Characterization of chemotherapy mobilized peripheral blood progenitor cells for use in autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10(3):281-5.
39. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, et al. Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 1995;13(8):1922-32.
40. Martin-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, Garcia J. CD7 expression on CD34+ cells from chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *Am J Hematol* 1999;61(3):178-86.

41. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966;44(3):287-99.
42. Pluznik DH, Sachs L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 1965;66(3):319-24.
43. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, et al. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 1999;84(12):1110-49.
44. Champlin R. Optimizing the composition of bone marrow for allogeneic transplantation. *J Hematother* 1995;4(1):53-60.
45. Engel H, Kaya E, Bald R, Kolhagen H, Grecu O, Schondorf T, et al. Fetal cord blood as an alternative source of hematopoietic progenitor cells: immunophenotype, maternal cell contamination, and ex vivo expansion. *J Hematother* 1999;8(2):141-55.
46. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors. *Blood* 1995;86(7):2494-9.
47. Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;79(12):3101-9.
48. Berridge MV, Fraser JK, Carter JM, Lin FK. Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood* 1988;72(3):970-7.
49. Roth P, Stanley ER. The biology of CSF-1 and its receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;181:141-67.
50. Mackarechtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995;3(1):147-61.
51. Breems DA, Blokland EA, Siebel KE, Mayen AE, Engels LJ, Ploemacher RE. Stroma-contact prevents loss of hematopoietic stem cell quality during ex vivo expansion of CD34⁺ mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 1998;91(1):111-7.
52. Yu H, Bauer B, Lipke GK, Phillips RL, Van Zant G. Apoptosis and hematopoiesis in murine fetal liver. *Blood* 1993;81(2):373-84.
53. Ogawa M, Yonemura Y, Ku H. In vitro expansion of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997;15 Suppl 1:7-11; discussion 12.
54. Peault B. Hematopoietic stem cell emergence in embryonic life: developmental hematology revisited. *J Hematother* 1996;5(4):369-78.

55. Lobach DF, Haynes BF. Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J Clin Immunol* 1987;7(2):81-97.
56. Phillips JH, Hori T, Nagler A, Bhat N, Spits H, Lanier LL. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *J Exp Med* 1992;175(4):1055-66.
57. Orloff MS, Fallon MA, DeMara E, Coppage ML, Leong N, Cerilli J. Induction of specific tolerance to small-bowel allografts. *Surgery* 1994;116(2):222-8.
58. Mychaliska GB, Muench MO, Rice HE, Leavitt AD, Cruz J, Harrison MR. The biology and ethics of banking fetal liver hematopoietic stem cells for in utero transplantation. *J Pediatr Surg* 1998;33(2):394-9.
59. Yao AC, Lind J, Tiisala R, Michelsson K. Placental transfusion in the premature infant with observation on clinical course and outcome. *Acta Paediatr Scand* 1969;58(6):561-6.
60. Yao AC, Moinian M, Lind J. Distribution of blood between infant and placenta after birth. *Lancet* 1969;2(7626):871-3.
61. Pafumi C, Milone G, Maggi I, Mancari R, Farina M, Russo A, et al. Umbilical cord blood collection in Cesarean section: a comparison before and after placental delivery. *Arch Gynecol Obstet* 2002;266(4):193-4.
62. Yao AC, Lind J. Placental transfusion. *Am J Dis Child* 1974;127(1):128-41.
63. Hofmeyr GJ, Gobetz L, Bex PJ, Van der Griendt M, Nikodem C, Skapinker R, et al. Periventricular/intraventricular hemorrhage following early and delayed umbilical cord clamping. A randomized controlled trial. *Online J Curr Clin Trials* 1993;Doc No 110:[2002 words; 26 paragraphs].
64. Kinmond S, Aitchison TC, Holland BM, Jones JG, Turner TL, Wardrop CA. Umbilical cord clamping and preterm infants: a randomised trial. *Bmj* 1993;306(6871):172-5.
65. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(10):3828-32.
66. Dracker RA. Cord blood stem cells: how to get them and what to do with them. *J Hematother* 1996;5(2):145-8.
67. Thomas IL, Jeffers TM, Brazier JM, Burt CL, Barr KE. Does cord drainage of placental blood facilitate delivery of the placenta? *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1990;30(4):314-8.

68. Elchalal U, Fasouliotis SJ, Shtockheim D, Brautbar C, Schenker JG, Weinstein D, et al. Postpartum umbilical cord blood collection for transplantation: a comparison of three methods. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(1 Pt 1):227-32.
69. Lasky LC, Lane TA, Miller JP, Lindgren B, Patterson HA, Haley NR, et al. In utero or ex utero cord blood collection: which is better? *Transfusion* 2002;42(10):1261-7.
70. Poli F, Crespiatico L, Lecchi L, Sirchia G, Scalapogna M, Sirchia SM, et al. Highly sensitive chemiluminescent method for the detection of maternal cell contamination in human cord blood stored for allotransplantation: the experience of the Milano cord blood bank. *Blood* 1997;89(8):3061-2.
71. Scaradavou A, Carrier C, Mollen N, Stevens C, Rubinstein P. Detection of maternal DNA in placental/umbilical cord blood by locus-specific amplification of the noninherited maternal HLA gene. *Blood* 1996;88(4):1494-500.
72. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995;86(10):3961-9.
73. Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, Pearce R, Fielding A, Devereux S, et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1997;15(2):535-46.
74. Hohaus S, Goldschmidt H, Ehrhardt R, Haas R. Successful autografting following myeloablative conditioning therapy with blood stem cells mobilized by chemotherapy plus rhG-CSF. *Exp Hematol* 1993;21(4):508-14.
75. Bensinger WI, Weaver CH, Appelbaum FR, Rowley S, Demirer T, Sanders J, et al. Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85(6):1655-8.
76. Pecora AL, Preti RA, Gleim GW, Jennis A, Zahos K, Cantwell S, et al. CD34+CD33- cells influence days to engraftment and transfusion requirements in autologous blood stem-cell recipients. *J Clin Oncol* 1998;16(6):2093-104.
77. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirkson MK, Slaper-Cortenbach IC, Schaasberg WP, et al. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+

cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1995;85(11):3313-9.

78. Solves P, Moraga R, Saucedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L, et al. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(4):269-73.

79. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, et al. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34+ cells. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25(3-4):141-6.

80. Campain JA, Terrell KL, Tomczak JA, Shpall EJ, Hami LS, Harrison GS. Comparison of retroviral-mediated gene transfer into cultured human CD34+ hematopoietic progenitor cells derived from peripheral blood, bone marrow, and fetal umbilical cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3(5):273-81.

81. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, van Beurden CA, Baert MR, Chan PL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1991;78(10):2527-33.

82. Breems DA, Blokland EA, Neben S, Ploemacher RE. Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* 1994;8(7):1095-104.

83. Shields LE, Lindton B, Andrews RG, Westgren M. Fetal hematopoietic stem cell transplantation: a challenge for the twenty-first century. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11(4):617-31.

84. Evans MI, Harrison MR, Flake AW, Johnson MP. Fetal therapy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16(5):671-83.

85. Surbek DV, Holzgreve W, Nicolaides KH. Haematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use? *Hum Reprod Update* 2001;7(1):85-91.

86. Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. *Blood* 1999;94(7):2179-91.

87. Zanjani ED. The human sheep xenograft model for the study of the in vivo potential of human HSC and in utero gene transfer. *Stem Cells* 2000;18(2):151.

88. Goldman JM, Horowitz MM. The international bone marrow transplant registry. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 1:393-7.

89. Pschera H. Stem cell therapy in utero. *J Perinat Med* 2000;28(5):346-54.

90. Jones DR. In utero stem cell transplantation: two steps forward but one step back? *Expert Opin Biol Ther* 2001;1(2):205-12.
91. Burgio GR, Locatelli F. Transplant of bone marrow and cord blood hematopoietic stem cells in pediatric practice, revisited according to the fundamental principles of bioethics. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(12):1163-8.
92. Gene Therapy Advisory Committee: report on the potential use of gene therapy in utero. *Dis Markers* 1998;14(3):151-4.
93. Anderson F, Glasier A, Ross J, Baird DT. Attitudes of women to fetal tissue research. *J Med Ethics* 1994;20(1):36-40.
94. Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED. Transplantation of fetal hematopoietic stem cells in utero: the creation of hematopoietic chimeras. *Science* 1986;233(4765):776-8.
95. Noia G, Pierelli L, Bonanno G, Monego G, Perillo A, Rutella S, et al. A novel route of transplantation of human cord blood stem cells in preimmune fetal sheep: the intracelomic cavity. *Stem Cells* 2003;21(6):638-46.
96. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Nutrition of the human fetus during the first trimester--a review. *Placenta* 2001;22 Suppl A:S70-7.
97. Luckett WP. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat* 1975;144(2):149-67.
98. Luckett WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152(1):59-97.
99. Bianchi DW, Wilkins-Haug LE, Enders AC, Hay ED. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet* 1993;46(5):542-50.
100. Jones CJ, Jauniaux E. Ultrastructure of the materno-embryonic interface in the first trimester of pregnancy. *Micron* 1995;26(2):145-73.
101. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Kushwaha A, Bieniarz A, Fortman J. Assessment of the risk of fetal loss after the coelocentesis procedure using a baboon model. *Fetal Diagn Ther* 1998;13(4):257-60.
102. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Campbell S, Collins WP, Ooms HA. Relationship between protein concentrations in embryological fluids and maternal serum and yolk sac size during human early pregnancy. *Hum Reprod* 1994;9(1):161-6.

103. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth-promoting effects of different fractions of extra-embryonic coelomic fluid on embryonic development. *Anat Histol Embryol* 2000;29(4):225-34.
104. Hesseldahl H, Larsen JF. Ultrastructure of human yolk sac: endoderm, mesenchyme, tubules and mesothelium. *Am J Anat* 1969;126(3):315-35.
105. Huyhn A, Dommergues M, Izac B, Croisille L, Katz A, Vainchenker W, et al. Characterization of hematopoietic progenitors from human yolk sacs and embryos. *Blood* 1995;86(12):4474-85.
106. Gonzalez-Crussi F, Roth LM. The human yolk sac and yolk sac carcinoma. An ultrastructural study. *Hum Pathol* 1976;7(6):675-91.
107. Takashina T. Haemopoiesis in the human yolk sac. *J Anat* 1987;151:125-35.
108. Kurjak A, Kupesic S, Kostovic L. Vascularization of yolk sac and vitelline duct in normal pregnancies studied by transvaginal color and pulsed Doppler. *J Perinat Med* 1994;22(5):433-40.
109. Kurjak A, Kupesic S, Kos M. Three-dimensional sonography for assessment of morphology and vascularization of the fetus and placenta. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9(4):186-202.
110. Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(3):718-24.
111. Castellucc M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000;6(5):485-94.
112. Jauniaux E, Burton GJ, Moscoso GJ, Hustin J. Development of the early human placenta: a morphometric study. *Placenta* 1991;12(3):269-76.
113. O'Rahilly R. Human embryo. *Nature* 1987;329(6138):385.
114. Santolaya-Forgas J. Physiology of the menstrual cycle by ultrasonography. *J Ultrasound Med* 1992;11(4):139-42.
115. Santolaya-Forgas J, Ramakrishnan V, Scommegna A. The menstrual cycle: relations of biophysical and hormonal determinations in normal women of reproductive age. *Fertil Steril* 1992;58(6):1230-3.

116. Deaton JL, Honore GM, Huffman CS, Bauguess P. Early transvaginal ultrasound following an accurately dated pregnancy: the importance of finding a yolk sac or fetal heart motion. *Hum Reprod* 1997;12(12):2820-3.
117. Jurkovic D, Gruboeck K, Campbell S. Ultrasound features of normal early pregnancy development. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995;7(6):493-504.
118. Bree RL, Marn CS. Transvaginal sonography in the first trimester: embryology, anatomy, and hCG correlation. *Semin Ultrasound CT MR* 1990;11(1):12-21.
119. Fossum GT, Davajan V, Kletzky OA. Early detection of pregnancy with transvaginal ultrasound. *Fertil Steril* 1988;49(5):788-91.
120. Mantoni M, Pedersen JF. Ultrasound visualization of the human yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1979;7(6):459-60.
121. Nyberg DA, Mack LA, Harvey D, Wang K. Value of the yolk sac in evaluating early pregnancies. *J Ultrasound Med* 1988;7(3):129-35.
122. Goldstein I, Zimmer EA, Tamir A, Peretz BA, Paldi E. Evaluation of normal gestational sac growth: appearance of embryonic heartbeat and embryo body movements using the transvaginal technique. *Obstet Gynecol* 1991;77(6):885-8.
123. Sauerbrei E, Cooperberg PL, Poland BJ. Ultrasound demonstration of the normal fetal yolk sac. *J Clin Ultrasound* 1980;8(3):217-20.
124. Mara E, Foster GS. Spontaneous regression of a yolk sac associated with embryonic death. *J Ultrasound Med* 2000;19(9):655-6.
125. Makikallio K, Tekay A, Jouppila P. Yolk sac and umbilicoplacental hemodynamics during early human embryonic development. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;14(3):175-9.
126. Stampone C, Nicotra M, Muttinelli C, Cosmi EV. Transvaginal sonography of the yolk sac in normal and abnormal pregnancy. *J Clin Ultrasound* 1996;24(1):3-9.
127. Figueras F, Torrents M, Munoz A, Comas C, Antolin E, Echevarria M, et al. Three-dimensional yolk and gestational sac volume. A prospective study of prognostic value. *J Reprod Med* 2003;48(4):252-6.
128. Levi CS, Lyons EA, Lindsay DJ. Early diagnosis of nonviable pregnancy with endovaginal US. *Radiology* 1988;167(2):383-5.
129. Jauniaux E, Jurkovic D, Henriët Y, Rodesch F, Hustin J. Development of the secondary human yolk sac: correlation of sonographic and anatomical features. *Hum Reprod* 1991;6(8):1160-6.

130. Kupesic S, Kurjak A. Volume and vascularity of the yolk sac assessed by three-dimensional and power doppler ultrasound. *Early Pregnancy* 2001;5(1):40-1.
131. Robinson HP. "Gestation sac" volumes as determined by sonar in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1975;82(2):100-7.
132. Jeanty P, Renoy P, Van Kerkem J, Dagnelie J, Struyven J. Ultrasonic demonstration of the amnion. *J Ultrasound Med* 1982;1(6):243-7.
133. Blackburn S, Loper D. *Maternal, Fetal, and Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*. Second edition ed. Philadelphia: HARCOURT PUBLISHERS LTD; 1992.
134. Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J, D'Ancona RL, Morgan J, Kauffman RP. Evolution of the amniotic sac and extracelomic space as seen by early ultrasound examination. *Fetal Diagn Ther* 2003;18(4):262-9.
135. Gulbis B, Jauniaux E, Jurkovic D, Gervy C, Ooms HA. Biochemical investigation of fetal renal maturation in early pregnancy. *Pediatr Res* 1996;39(4 Pt 1):731-5.
136. Campbell J, Wathen N, Perry G, Soneji S, Sourial N, Chard T. The coelomic cavity: an important site of materno-fetal nutrient exchange in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100(8):765-7.
137. Santolaya-Forgas J, Vengalil S, Meyer W, Fortman J. Transvaginal ultrasonographic (TVS) evaluation of baboon gestation from 37-62 days postconception. *Am J Primatol* 1997;43:323-8.
138. Weissman A, Itskovitz-Eldor J, Jakobi P. Sonographic measurement of amniotic fluid volume in the first trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med* 1996;15(11):771-4.
139. Elejalde BR, de Elejalde MM, Acuna JM, Thelen D, Trujillo C, Karrmann M. Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility, risks, complications and use in early genetic prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1990;35(2):188-96.
140. Penso CA, Sandstrom MM, Garber MF, Ladoulis M, Stryker JM, Benacerraf BB. Early amniocentesis: report of 407 cases with neonatal follow-up. *Obstet Gynecol* 1990;76(6):1032-6.
141. Penso CA, Frigoletto FD, Jr. Early amniocentesis. *Semin Perinatol* 1990;14(6):465-70.
142. Nevin J, Nevin NC, Dornan JC, Sim D, Armstrong MJ. Early amniocentesis: experience of 222 consecutive patients, 1987-1988. *Prenat Diagn* 1990;10(2):79-83.

143. Tharmaratnam S, Sadek S, Steele EK, Harper MA, Stewart FJ, Nevin J, et al. Early amniocentesis: effect of removing a reduced volume of amniotic fluid on pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 1998;18(8):773-8.
144. Roper EC, Konje JC, De Chazal RC, Duckett DP, Oppenheimer CA, Taylor DJ. Genetic amniocentesis: gestation-specific pregnancy outcome and comparison of outcome following early and traditional amniocentesis. *Prenat Diagn* 1999;19(9):803-7.
145. Hsieh FJ, Shyu MK, Sheu BC, Lin SP, Chen CP, Huang FY. Limb defects after chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol* 1995;85(1):84-8.
146. Froster UG, Jackson L. Limb defects and chorionic villus sampling: results from an international registry, 1992-94. *Lancet* 1996;347(9000):489-94.
147. Reece EA, Homko CJ, Wiznitzer A, Goldstein I. Needle embryofetoscopy and early prenatal diagnosis. *Fetal Diagn Ther* 1995;10(2):81-2.
148. Reece EA. First trimester prenatal diagnosis: embryoscopy and fetoscopy. *Semin Perinatol* 1999;23(5):424-33.
149. Reece EA, Homko CJ, Koch S, Chan L. First-trimester needle embryofetoscopy and prenatal diagnosis. *Fetal Diagn Ther* 1997;12(3):136-9.
150. Nagamani M, McDonough PG, Ellegood JO, Mahesh VB. Maternal and amniotic fluid steroids throughout human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134(6):674-80.
151. Evans MI, Drugan A, Koppitch FC, 3rd, Zador IE, Sacks AJ, Sokol RJ. Genetic diagnosis in the first trimester: the norm for the 1990s. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160(6):1332-6; discussion 1336-9.
152. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Early amniocentesis: alphafetoprotein levels in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid and maternal serum between 8 and 13 weeks. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98(9):866-70.
153. Soothill PW, Nicolaides KH, Rodeck CH, Campbell S. Amniotic fluid and fetal tissues are not heated by obstetric ultrasound scanning. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94(7):675-7.
154. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Gervy C, Ooms HA, Campbell S. Biochemical composition of exocoelomic fluid in early human pregnancy. *Obstet Gynecol* 1991;78(6):1124-8.
155. Wathen NC, Cass PL, Kitau MJ, Chard T. Human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein levels in matched samples of amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 1991;11(3):145-51.

156. Santolaya-Forgas J, De León-Luis JA, Pinkston J, Siddiqui A. Specific and degenerative primers for Rh D/CE blood type could be a way for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells in baboon model. In: 50^a Annual Scientific Meeting. Society for Gynecologic Investigation. Washington.: Society for Gynecologic Investigation; 2003. p. A89-A204.
157. Santolaya-Forgas J, De Leon-Luis J. Celocentesis y su utilización en el diagnóstico prenatal, conocimiento de la dinámica de líquidos en el embarazo temprano y tratamiento intrauterino utilizando células madre progenitoras. In: XI Congreso Nacional de la Asociación Española de Diagnóstico Prenatal; 2002; Madrid.; 2002.
158. Jauniaux E, Pahal GS, Rodeck CH. What invasive procedure to use in early pregnancy? *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(4):651-62.
159. Wagner RJ. Chorionic villous sampling. In: Lemery JS-FaD, editor. *Interventional Ultrasound in Obstetrics, Gynaecology and the Breast*. 1^o ed: Blackwell Science Inc.; 1998. p. 45-59.
160. Ross JA, Jurkovic D, Nicolaides K. Coelocentesis: a study of short-term safety. *Prenat Diagn* 1997;17(10):913-7.
161. Makrydimas G, Lolis D, Georgiou I, Navrozoglou I, Nicolaides KH. Feto-maternal bleeding following coelocentesis. *Hum Reprod* 1997;12(4):845-6.
162. Makrydimas G, Kaponis A, Skentou C, Lolis D. Short-term safety of celocentesis for the mother and the fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;19(3):243-5.
163. Santolaya-Forgas J, Hewitt T, Mc Corquodale M, Shen Z, De Christopher P. ABO/Rh(D) status, karyotype and FISH with human specific X and Y probes: Relatively simple ways for detecting chimerism after in-utero transfusion of human progenitor cells in the baboon model. In: 2000 Annual Meeting of The American Society of Human Genetics; 2000; 2000. p. 400.
164. Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. Quantitative evaluation of fluorescence in situ hybridization (FISH) signals in uncultured coelomic cells. *Prenat Diagn* 1997;17(7):635-42.
165. Van den Veyver IB, Chong SS, Cota J, Bennett PR, Fisk NM, Handyside AH, et al. Single-cell analysis of the RhD blood type for use in preimplantation diagnosis in the prevention of severe hemolytic disease of the newborn. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(2 Pt 1):533-40.

166. Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001;15(2):293-302.
167. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements--a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151(3):333-7.
168. Armitage P, Berry G. Análisis avanzado de datos de regresión lineal. In: Doyma, editor. *Estadística para la investigación Biomédica*. Barcelona; 1992. p. 307-345.
169. Alvarez R. Estadística no paramétrica. El procedimiento Npar. In: Santos Dd, editor. *Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS*. Madrid; 1995. p. 305-382.
170. Thornburg KL, Burry KJ, Adams AK, Kirk EP, Faber JJ. Permeability of placenta to inulin. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158(5):1165-9.
171. Jauniaux E, Lees C, Jurkovic D, Campbell S, Gulbis B. Transfer of inulin across the first-trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176(1 Pt 1):33-6.
172. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Collins WP, Zaidi J, Campbell S. Investigation of the acid-base balance of coelomic and amniotic fluids in early human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(5 Pt 1):1365-9.
173. Shannon C, Jauniaux E, Gulbis B, Thiry P, Sitham M, Bromley L. Placental transfer of fentanyl in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13(8):2317-20.
174. Cooper J, Jauniaux E, Gulbis B, Quick D, Bromley L. Placental transfer of fentanyl in early human pregnancy and its detection in fetal brain. *Br J Anaesth* 1999;82(6):929-31.
175. Jauniaux E, Gulbis B, Gerlo E, Rodeck C. Free amino acid distribution inside the first trimester human gestational sac. *Early Hum Dev* 1998;51(2):159-69.
176. Jauniaux E, Sherwood RA, Jurkovic D, Boa FG, Campbell S. Amino acid concentrations in human embryological fluids. *Hum Reprod* 1994;9(6):1175-9.
177. Campbell J, Wathen N, Lewis M, Fingerova H, Chard T. Erythropoietin levels in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99(12):974-6.
178. Campbell J, Wathen N, Macintosh M, Cass P, Chard T, Mainwaring Burton R. Biochemical composition of amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99(7):563-5.

179. Jauniaux E, Gulbis B, Jurkovic D, Schaaps JP, Campbell S, Meuris S. Protein and steroid levels in embryonic cavities in early human pregnancy. *Hum Reprod* 1993;8(5):782-7.
180. Denison FC, Riley SC, Wathen NC, Chard T, Calder AA, Kelly RW. Differential concentrations of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 within the fluid compartments present during the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13(8):2292-5.
181. Wathen NC, Delves HT, Campbell DJ, Chard T. The coelomic cavity--a reservoir for metals. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(6):1884-8.
182. Luisi S, Battaglia C, Florio P, D'Ambrogio G, Taponeco F, Santuz M, et al. Activin A and inhibin B in extra-embryonic coelomic and amniotic fluids, and maternal serum in early pregnancy. *Placenta* 1998;19(5-6):435-8.
183. Riley SC, Balfour C, Wathen NC, Chard T, Evans LW, Groome NP, et al. Follistatin and activin A in extra-embryonic coelomic and amniotic fluids and maternal serum in early pregnancy. *Hum Reprod* 1998;13(9):2624-8.
184. Jauniaux E, Gulbis B, Nagy AM, Jurkovic D, Campbell S, Meuris S. Coelomic fluid chorionic gonadotrophin and protein concentrations in normal and complicated first trimester human pregnancies. *Hum Reprod* 1995;10(1):214-20.
185. Nagy AM, Jauniaux E, Jurkovic D, Meuris S. Placental production of human chorionic gonadotrophin alpha and beta subunits in early pregnancy as evidenced in fluid from the exocoelomic cavity. *J Endocrinol* 1994;142(3):511-6.
186. Opsjon SL, Novick D, Wathen NC, Cope AP, Wallach D, Aderka D. Soluble tumor necrosis factor receptors and soluble interleukin-6 receptor in fetal and maternal sera, coelomic and amniotic fluids in normal and pre-eclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol* 1995;29(2):119-34.
187. Wathen NC, Cass PL, Campbell DJ, Kitau MJ, Chard T. Levels of placental protein 14, human placental lactogen and unconjugated oestriol in extraembryonic coelomic fluid. *Placenta* 1992;13(2):195-7.
188. Atkinson G, Campbell DJ, Cawood ML, Oakey RE. Steroids in human intrauterine fluids of early pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44(4):435-40.
189. Gulbis B, Jauniaux E, Decuyper J, Thiry P, Jurkovic D, Campbell S. Distribution of iron and iron-binding proteins in first-trimester human pregnancies. *Obstet Gynecol* 1994;84(2):289-93.

190. Jauniaux E, Gulbis B, Hyett J, Nicolaides KH. Biochemical analyses of mesenchymal fluid in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(4):765-9.
191. Steegers-Theunissen RP, Wathen NC, Eskes TK, van Raaij-Selten B, Chard T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104(1):20-4.
192. Iles RK, Wathen NC, Campbell DJ, Chard T. Human chorionic gonadotrophin and subunit composition of maternal serum and coelomic and amniotic fluids in the first trimester of pregnancy. *J Endocrinol* 1992;135(3):563-9.
193. Miell JP, Jauniaux E, Langford KS, Westwood M, White A, Jones JS. Insulin-like growth factor binding protein concentration and post-translational modification in embryological fluid. *Mol Hum Reprod* 1997;3(4):343-9.
194. Jauniaux E, Gulbis B, Acharya G, Thiry P, Rodeck C. Maternal tobacco exposure and cotinine levels in fetal fluids in the first half of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999;93(1):25-9.
195. Jauniaux E, Mignot TM, Rebourcet R, Robert B, Ferre F. Placental endothelin gene expression and endothelin concentration in fetal fluids of the first trimester gestational sac. *Mol Hum Reprod* 2000;6(8):758-62.
196. Wathen NC, Campbell DJ, Patel B, Touzel R, Chard T. Dynamics of prolactin in amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid in early human pregnancy. *Early Hum Dev* 1993;35(3):167-72.
197. Maymon R, Jauniaux E, Rodeck C, Zaspin L, Moroz C. Comparison of placental iso ferritin levels in maternal serum and coelomic and amniotic fluids during first trimester human gestation. *Hum Reprod* 1998;13(4):1044-6.
198. Campbell J, Wathen NC, Merryweather I, Abbott R, Muller D, Chard T. Concentrations of vitamins A and E in amniotic fluid, extraembryonic coelomic fluid, and maternal serum in the first trimester of pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994;71(1):F49-50.
199. Jauniaux E, Jurkovic D, Gulbis B, Liesnard C, Lees C, Campbell S. Materno-fetal immunoglobulin transfer and passive immunity during the first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod* 1995;10(12):3297-300.
200. Iles RK, Wathen NC, Sharma KB, Campbell J, Grudzinskas JG, Chard T. Pregnancy-associated plasma protein A levels in maternal serum, extraembryonic coelomic and amniotic fluids in the first trimester. *Placenta* 1994;15(7):693-9.

201. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, Asuncion M, Gervy C, Contempre B, et al. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(4):1768-77.
202. O'Rahilly R, Muller F, Bossy J. [Atlas of the stages of development of the nervous system in the intact human embryo]. *Arch Anat Histol Embryol* 1982;65:57-76.
203. Cowan MJ, Tarantal AF, Capper J, Harrison M, Garovoy M. Long-term engraftment following in utero T cell-depleted parental marrow transplantation into fetal rhesus monkeys. *Bone Marrow Transplant* 1996;17(6):1157-65.
204. Cowan MJ, Chou SH, Tarantal AF. Tolerance induction post in utero stem cell transplantation. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2001(33):145-71.
205. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991;17(2):313-29.
206. Lefebvre P, Winter JN, Kahn LE, Giri JG, Cohen I. Megakaryocyte ex vivo expansion potential of three hematopoietic sources in serum and serum-free medium. *J Hematother* 1999;8(2):199-208.
207. Lefebvre P, Winter JN, Meng Y, Cohen I. Ex vivo expansion of early and late megakaryocyte progenitors. *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(6):913-21.
208. Aglietta M, Bertolini F, Carlo-Stella C, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, et al. Ex vivo expansion of hematopoietic cells and their clinical use. *Haematologica* 1998;83(9):824-48.
209. Pawliuk R, Eaves C, Humphries RK. Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 1996;88(8):2852-8.
210. Sandstrom CE, Collins PC, McAdams TA, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM. Comparison of whole serum-deprived media for ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells from cord blood and mobilized peripheral blood mononuclear cells. *J Hematother* 1996;5(5):461-73.
211. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(2):503-9.
212. Surbek DV, Holzgreve W. Fetal cells from cord blood as stem cell source: current status and possible implications in gynaecologic oncology. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001;22(1):6-12.

213. Surbek DV, Aufderhaar U, Holzgreve W. Umbilical cord blood collection for transplantation: which technique should be preferred? *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(6):1587-8.
214. Surbek DV, Schonfeld B, Tichelli A, Gratwohl A, Holzgreve W. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant* 1998;22(3):311-2.
215. Shields LE, Andrews RG. Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178(5):931-7.
216. Lu L, Shen RN, Broxmeyer HE. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. *Crit Rev Oncol Hematol* 1996;22(2):61-78.
217. Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM. Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. *Biotechnology (N Y)* 1994;12(9):909-14.
218. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 1996;183(6):2551-8.
219. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, et al. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 1998;12(5):718-27.
220. Bagley J, Rosenzweig M, Marks DF, Pykett MJ. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel three-dimensional device. *Exp Hematol* 1999;27(3):496-504.
221. Banu N, Rosenzweig M, Kim H, Bagley J, Pykett M. Cytokine-augmented culture of haematopoietic progenitor cells in a novel three-dimensional cell growth matrix. *Cytokine* 2001;13(6):349-58.
222. Muench MO, Moore MA. Accelerated recovery of peripheral blood cell counts in mice transplanted with in vitro cytokine-expanded hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 1992;20(5):611-8.

223. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Hijiya N, Zhang J, Zon G, et al. In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(24):11823-7.
224. Hirayama F, Shih JP, Awgulewitsch A, Warr GW, Clark SC, Ogawa M. Clonal proliferation of murine lymphohemopoietic progenitors in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(13):5907-11.
225. Bhatia R, McGlave PB, Miller JS, Wissink S, Lin WN, Verfaillie CM. A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. *Exp Hematol* 1997;25(9):980-91.
226. Brandt J, Srouf EF, van Besien K, Briddell RA, Hoffman R. Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow. *J Clin Invest* 1990;86(3):932-41.
227. Andrews RG, Briddell RA, Hill R, Gough M, McNiece IK. Engraftment of primates with G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ progenitor cells expanded in G-CSF, SCF and MGDF decreases the duration and severity of neutropenia. *Stem Cells* 1999;17(4):210-8.
228. Santolaya-Forgas J, Duval J, Prespin C, Vengalil S, Kushwaha A, Wilson L, et al. Extracoelomic fluid osmometry and electrolyte composition during early gestation in the baboon. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(5):1124-7.
229. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2954-9.
230. Jauniaux E, Gulbis B. Fluid compartments of the embryonic environment. *Hum Reprod Update* 2000;6(3):268-78.
231. Martina NA, Kim E, Chitkara U, Wathen NC, Chard T, Giudice LC. Gestational age-dependent expression of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) phosphoisoforms in human extraembryonic cavities, maternal serum, and decidua suggests decidua as the primary source of IGFBP-1 in these fluids during early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(6):1894-8.
232. Nonoshita LD, Wathen NC, Dsupin BA, Chard T, Giudice LC. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy: their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(5):1249-55.

233. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. *J Anat* 2001;198(Pt 6):651-62.
234. Gitlin D, Perricelli A. Synthesis of serum albumin, prealbumin, alpha-foetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin by the human yolk sac. *Nature* 1970;228(275):995-7.
235. Shi WK, Hopkins B, Thompson S, Heath JK, Luke BM, Graham CF. Synthesis of apolipoproteins, alphafoetoprotein, albumin, and transferrin by the human foetal yolk sack and other foetal organs. *J Embryol Exp Morphol* 1985;85:191-206.
236. Gulbis B, Jauniaux E, Cotton F, Stordeur P. Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. *Mol Hum Reprod* 1998;4(9):857-62.
237. Contempre B, Jauniaux E, Calvo R, Jurkovic D, Campbell S, de Escobar GM. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77(6):1719-22.
238. Lemery DJ, Santolaya-Forgas J, Wilson L, Jr., Bieniarz A, Warsof SL. A non-human primate model for the in utero chronic catheterization of the umbilical vein. A preliminary report. *Fetal Diagn Ther* 1995;10(5):326-32.
239. Shields LE, Bryant EM, Easterling TR, Andrews RG. Fetal liver cell transplantation for the creation of lymphohematopoietic chimerism in fetal baboons. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(4):1157-60.
240. Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. The Canadian Early and Mid-trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. *Lancet* 1998;351(9098):242-7.
241. Atkinson G, Rane V, Linton G, Campbell J. Early prenatal diagnosis of fetal aneuploidy using coelomic fluid. *Early Hum Dev* 1996;47 Suppl:S103-4.
242. Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. Early prenatal diagnosis: standard cytogenetic analysis of coelomic cells obtained by coelocentesis. *Prenat Diagn* 1996;16(10):945-9.
243. Cruger DG, Bruun-Petersen G, Kolvraa S. Turner's syndrome 45,X found by coelocentesis. *Prenat Diagn* 1997;17(6):588-9.
244. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Zikopoulos K, Lolis D. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia by coelocentesis. *Mol Hum Reprod* 1997;3(8):729-31.

245. Makrydimas G, Georgiou I, Kranas V, Kaponis A, Lolis D. Prenatal paternity testing using DNA extracted from coelomic cells. *Fetal Diagn Ther* 2004;19(1):75-7.
246. Lau TK, Fung TY, Wong YF, Fung HY. A study of fetal sex determination in coelomic fluid. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45(1):16-8.
247. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Pandya P, Cardy DL, Nicolaides KH. Coelocentesis: a new technique for early prenatal diagnosis. *Lancet* 1993;341(8861):1623-4.
248. Jurkovic D, Jauniaux E, Campbell S, Mitchell M, Lees C, Layton M. Detection of sickle gene by coelocentesis in early pregnancy: a new approach to prenatal diagnosis of single gene disorders. *Hum Reprod* 1995;10(5):1287-9.
249. Pandya PP, Cardy DL, Jauniaux E, Campbell S, Nicolaides KH. Rapid determination of fetal sex in coelomic and amniotic fluid by fluorescence in situ hybridisation. *Fetal Diagn Ther* 1995;10(1):66-70.
250. Findlay I, Atkinson G, Chambers M, Quirke P, Campbell J, Rutherford A. Rapid genetic diagnosis at 7-9 weeks gestation: diagnosis of sex, single gene defects and DNA fingerprint from coelomic samples. *Hum Reprod* 1996;11(11):2548-53.
251. Jauniaux E, Cirigliano V, Adinolfi M. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Reprod Biomed Online* 2003;6(4):494-8.
252. Touraine JL. In utero transplantation of fetal liver stem cells in humans. *Blood Cells* 1991;17(2):379-87.
253. Touraine JL. Treatment of human fetuses and induction of immunological tolerance in humans by in utero transplantation of stem cells into fetal recipients. *Acta Haematol* 1996;96(3):115-9.
254. Flake AW, Roncarolo MG, Puck JM, Almeida-Porada G, Evans MI, Johnson MP, et al. Treatment of X-linked severe combined immunodeficiency by in utero transplantation of paternal bone marrow. *N Engl J Med* 1996;335(24):1806-10.
255. Linch DC, Rodeck CH, Nicolaides K, Jones HM, Brent L. Attempted bone-marrow transplantation in a 17-week fetus. *Lancet* 1986;2(8521-22):1453.
256. Touraine JL, Raudrant D, Royo C, Rebaud A, Roncarolo MG, Souillet G, et al. In-utero transplantation of stem cells in bare lymphocyte syndrome. *Lancet* 1989;1(8651):1382.
257. Diukman R, Golbus MS. In utero stem cell therapy. *J Reprod Med* 1992;37(6):515-20.

258. Slavin S, Naparstek E, Ziegler M, Lewin A. Clinical application of intrauterine bone marrow transplantation for treatment of genetic diseases--feasibility studies. *Bone Marrow Transplant* 1992;9 Suppl 1:189-90.
259. Thilaganthan B, Nicolaides KH, Morgan G. Intrauterine bone-marrow transplantation at 12 weeks' gestation. *Lancet* 1993;342(8865):243.
260. Cowan MJ, Golbus M. In utero hematopoietic stem cell transplants for inherited diseases. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1994;16(1):35-42.
261. Westgren M, Ringden O, Eik-Nes S, Ek S, Anvret M, Brubakk AM, et al. Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. *Transplantation* 1996;61(8):1176-9.
262. Wengler GS, Lanfranchi A, Frusca T, Verardi R, Neva A, Brugnani D, et al. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDX1). *Lancet* 1996;348(9040):1484-7.
263. Touraine JL. In utero transplantation of fetal liver stem cells into human fetuses. *J Hematother* 1996;5(2):195-9.
264. Bambach BJ, Moser HW, Blakemore K, Corson VL, Griffin CA, Noga SJ, et al. Engraftment following in utero bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy. *Bone Marrow Transplant* 1997;19(4):399-402.
265. Hayward A, Ambruso D, Battaglia F, Donlon T, Eddelman K, Giller R, et al. Microchimerism and tolerance following intrauterine transplantation and transfusion for alpha-thalassemia-1. *Fetal Diagn Ther* 1998;13(1):8-14.
266. Monni G, Ibba RM, Zoppi MA, Floris M. In utero stem cell transplantation. *Croat Med J* 1998;39(2):220-3.
267. Leung W, Blakemore K, Jones RJ, Moser HW, Mukherjee G, Griffin CA, et al. A human-murine chimera model for in utero human hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5(1):1-7.
268. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000;95(11):3620-7.
269. Hayashi S, Abdulmalik O, Peranteau WH, Ashizuka S, Campagnoli C, Chen Q, et al. Mixed chimerism following in utero hematopoietic stem cell transplantation in murine models of hemoglobinopathy. *Exp Hematol* 2003;31(2):176-84.

270. Westgren M, Shields LE. In utero stem cell transplantation in humans. Ernst Schering Res Found Workshop 2001(33):197-221.
271. Srour EF, Zanjani ED, Brandt JE, Leemhuis T, Briddell RA, Heerema NA, et al. Sustained human hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult human bone marrow cells. *Blood* 1992;79(6):1404-12.
272. Zanjani ED, Ascensao JL, Harrison MR, Tavassoli M. Ex vivo incubation with growth factors enhances the engraftment of fetal hematopoietic cells transplanted in sheep fetuses. *Blood* 1992;79(11):3045-9.
273. Srour EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M, et al. Persistence of human multilineage, self-renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993;82(11):3333-42.
274. Pixley JS, Tavassoli M, Zanjani ED, Shaft DM, Futamachi KJ, Sauter T, et al. Transplantation in utero of fetal human hematopoietic stem cells into mice results in hematopoietic chimerism. *Pathobiology* 1994;62(5-6):238-44.
275. Zanjani ED, Srour EF, Hoffman R. Retention of long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted purified adult human bone marrow hematopoietic stem cells in sheep. *J Lab Clin Med* 1995;126(1):24-8.
276. Almeida-Porada GD, Hoffman R, Manalo P, Gianni AM, Zanjani ED. Detection of human cells in human/sheep chimeric lambs with in vitro human stroma-forming potential. *Exp Hematol* 1996;24(3):482-7.
277. Bernstein J, Boyle DW, Srour EF, Cooper R, Jacobs C, Freie B, et al. Variation in long-term engraftment of a large consecutive series of lambs transplanted in utero with human hematopoietic cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 1997;3(5):247-54.
278. Pixley JS, Zanjani ED, Shaft DM, Porada C, Mackintosh FR. Prolonged hematopoietic chimerism in normal mice transplanted in utero with human hematopoietic stem cells. *Pathobiology* 1998;66(5):230-9.
279. Turner CW, Archer DR, Wong J, Yeager AM, Fleming WH. In utero transplantation of human fetal haemopoietic cells in NOD/SCID mice. *Br J Haematol* 1998;103(2):326-34.
280. Omori F, Lutzko C, Abrams-Ogg A, Lau K, Gartley C, Dobson H, et al. Adoptive transfer of genetically modified human hematopoietic stem cells into preimmune canine fetuses. *Exp Hematol* 1999;27(2):242-9.

281. Tarantal AF, Goldstein O, Barley F, Cowan MJ. Transplantation of human peripheral blood stem cells into fetal rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Transplantation* 2000;69(9):1818-23.
282. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6(11):1282-6.
283. Huang S, Zeng F, Gong Z, Lu J, Huang W, Hu W, et al. [A study of the engraftment, expansion and differentiation of human hematopoietic stem cells in goats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002;82(2):86-9.
284. MacKenzie TC, Flake AW. Human mesenchymal stem cells: insights from a surrogate in vivo assay system. *Cells Tissues Organs* 2002;171(1):90-5.
285. Fujiki Y, Fukawa K, Kameyama K, Kudo O, Onodera M, Nakamura Y, et al. Successful multilineage engraftment of human cord blood cells in pigs after in utero transplantation. *Transplantation* 2003;75(7):916-22.
286. Shields LE, Gaur LK, Gough M, Potter J, Sieverkropp A, Andrews RG. In utero hematopoietic stem cell transplantation in nonhuman primates: the role of T cells. *Stem Cells* 2003;21(3):304-14.
287. Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 1993;364(6432):64-7.
288. Thilaganathan B, Abbas A, Nicolaides KH. Fetal blood natural killer cells in human pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 1993;8(3):149-53.
289. Merrill JD, Sigaroudinia M, Kohl S. Characterization of natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity of preterm infants against human immunodeficiency virus-infected cells. *Pediatr Res* 1996;40(3):498-503.
290. Lau AS, Sigaroudinia M, Yeung MC, Kohl S. Interleukin-12 induces interferon-gamma expression and natural killer cytotoxicity in cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 1996;39(1):150-5.
291. Hajdu K, Tanigawara S, McLean LK, Cowan MJ, Golbus MS. In utero allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to induce tolerance. *Fetal Diagn Ther* 1996;11(4):241-8.
292. Milner R, Shaaban A, Kim HB, Fichter C, Flake AW. Postnatal booster injections increase engraftment after in utero stem cell transplantation. *J Surg Res* 1999;83(1):44-7.